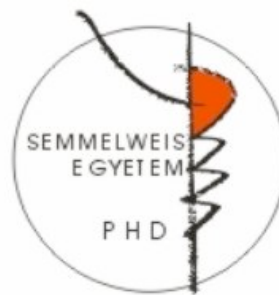


Fibrózis és tumorképződés jelátviteli folyamatainak morfológiai nyomonkövethetősége

Doktori értekezés

Dr. Fintha Attila

Semmelweis Egyetem
Elméleti és Transzlációs Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Sebe Attila, Ph.D., tudományos munkatárs

Hivatalos bírálók: Prof. Dr. Iványi Béla, MTA doktora, egyetemi tanár
Dr. Wágner László, Ph.D., egyetemi docens

Komplex vizsga bizottság elnöke: Prof. Dr. Reusz György,
MTA doktora, egyetemi tanár

Komplex vizsga bizottság tagjai: Dr. Lengyel Zoltán, Ph.D.,
osztályvezető főorvos
Dr. Sebestyén Anna, Ph.D.,
tudományos főmunkatárs

Budapest
2017

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Rövidítések jegyzéke	5
1 Bevezetés	8
1.1 Vesefibrózis jelentősége	8
1.2 A tubulointersticiális vesefibrózis morfológiája	9
1.3 A tubulointersticiális fibrózis sejtes elemei	12
1.4 Humorális elemek a tubulointersticiális fibrózisban	18
1.4.1 Renin-angiotenzin rendszer	18
1.4.2 Transzformáló Növekedési Faktor - béta (TGF- β)	19
1.4.3 Az AngII és TGF- β 1 közötti kapcsolat jellemzése	22
1.4.4 További hormonális faktorok tubulointersticiális fibrózisban	22
1.4.5 Glomeruláris sejtek szerepe a tubulointersticiális fibrózisban	23
1.5 Enzimatis elemek a tubulointersticiális fibrózisban	24
1.6 TGF- β hatása a vese epitél sejtekre és az EMT-re	26
1.7 Az α -SMA expresszió szabályozása az EMT során	28
1.8 A Suppressor of Cancer Cell Invasion (SCAI) fehérje szerepe	32
2 Célkitűzések	34
3 Módszerek	36
3.1 Anyagok és eszközök	36
3.2 Sejtkultúra	36
3.3 TGF- β 1 transzgenikus egértörzs	37
3.4 Plazmidok	38
3.4.1 Promótert és riporter gént tartalmazó konstruktok	38
3.4.2 Expressziós vektorok	38
3.5 Tranziens transzfekció és luciferáz promóter aktivitás mérés	39
3.6 A kísérletek során használt antitestek	40
3.7 Immunfluoreszens mikroszkópia	40
3.8 Humán szövetminták immunhisztokémiai vizsgálata	41
3.9 Kvantitatív RT-PCR mérés	42

3.10	Gén microarray adatelemzés.....	43
3.11	Statisztikai elemzés.....	43
4	Eredmények.....	45
4.1	A SCAI fehérje hatása az EMT folyamatában állati és humán sejttípusokban és szövetekben.....	45
4.1.1	A SCAI fehérje kifejeződése az LLC-PK ₁ /AT ₁ sejtekben.....	45
4.1.2	A SCAI fehérje gátolja a TGF- β 1 által indukált α -SMA promóter aktivitás fokozódást.....	47
4.1.3	SCAI fehérje gátolja a sejtkapcsoló struktúrák szétesése által indukált α -SMA promóter aktivitás fokozódást.....	48
4.1.4	TGF- β 1 hatására LLC-PK ₁ /AT ₁ sejtekben termelődő α -SMA fehérje mennyisége csökken SCAI fehérje jelenlétében.....	49
4.1.5	SCAI mRNS mennyisége csökken mIMCD-3 sejtekben TGF- β 1 kezelés hatására	51
4.1.6	SCAI mRNS expressziója csökken veseszövetben TGF- β 1 transzgenikus egérmodellben.....	51
4.2	A SCAI fehérje humán daganatmentes és rosszindulatú daganatos szövetekben, és a SCAI fehérje szerepe egyes daganatok kialakulásában.....	52
4.2.1	SCAI fehérje kimutatható különböző életkorú humán daganatmentes vesében	52
4.2.2	A SCAI fehérje kis mennyiségben van jelen humán daganatmentes fibrotikus veseszövetben	54
4.2.3	A SCAI fehérje kimutatható a vese egyes malignus daganataiban	55
4.2.4	SCAI gén mRNS expresszió csökken az emlő malignus daganataiban génexpressziós adatbázis adatai alapján	55
4.2.5	SCAI gén mRNS expresszió növekedik vastagbél malignus daganatban génexpressziós adatbázis adatai alapján	56
4.2.6	SCAI gén mRNS expresszió hasonló mértékű a vastagbél primer malignus daganatban és annak áttétében génexpressziós adatbázis adatai alapján.....	57
4.2.7	A SCAI fehérje kimutatható vastagbél malignus daganatban	58
4.3	A renin-angiotenzin rendszerhez tartozó AngIV hatása az ECM homeosztázisban szerepet játszó PAI-1 mennyiségnek szabályozására	60

4.3.1	Angiotenzin IV nem növeli a PAI-1 promóter aktivitást.....	60
4.3.2	Angiotenzin II dózisfüggő módon növeli a PAI-1 promóter aktivitását AT ₁ receptoron (AT ₁ R) keresztül.....	61
4.3.3	AngII PAI-1 promóter aktiváló hatása független a TGF- β 1 jelátviteli útban gátló hatású Smad7 jelenlététől	62
4.3.4	Az AngII PAI-1 promóter aktiváló hatásában sem az ERK, sem a JNK nem vesz részt.....	63
4.3.5	Az AngII PAI-1 promótert aktiváló hatásában tirozin-kinázok vesznek részt, azonban ezek között a protein kináz C (PKC) nem szerepel.....	64
5	Megbeszélés.....	66
6	Következtetések.....	73
7	Összefoglalás	76
8	Summary.....	77
9	Irodalomjegyzék	78
10	Saját publikációk jegyzéke	98
10.1	A disszertációhoz kapcsolódó közlemények	98
10.2	A disszertációtól független közlemények.....	98
11	Köszönetnyilvánítás.....	101

Rövidítések jegyzéke

AngII	Angiotensin II
AngIV	Angiotensin IV
AT ₁ R	Angiotensin II receptor, type 1
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Base-pair
Cdc42	Cell division cycle 42
CKD	Chronic Kidney Disease
CTGF	Connective tissue growth factor
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DN-JNK	Dominant negative c-Jun N-terminal kinase
DNS	Deoxyribonucleic acid
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DTT	Dithiothreitol
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EGTA	Egtazic acid
EMT	Epithelial Mesenchymal Transition
EndMT	Endothelial Mesenchymal Transition
FBS	Fetal Bovine Serum
FSP-1	Fibroblast-specific protein 1
GAPDH	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase
GFP	Green fluorescent protein
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HDAC1	Hystone deacetylase 1
HP1	Heterochromatin protein 1
HRP	Horseradish peroxidase
IGF	Insulin-like growth factor 1
JNK	c-Jun N-terminal kinase

KDM3B	Lysine-specific demethylase 3B
KH ₂ PO ₄	Monopotassium phosphate
LTBP	Latent TGF- β binding protein
Luc	Luciferase
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MMP	Matrix metalloproteinase
MRTF	Myocardin Related Transcription Factor
Myc	V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog
Na ₃ VO ₄	Sodium orthovanadate
NaCl	Sodium chloride
NaF	Sodium fluoride
optiMEM	Reduced Serum Media (modified Eagle's Minimum Essential Media)
PAI	Plasminogen activator inhibitor
PBS	Phosphate-buffered saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PDGF	Platelet-derived growth factor
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PIP	Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) interacting protein
PKC	Protein kinase C
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RhoA	Ras homolog gene family, member A
RIPA	RIPA Buffer
S100A4	S100 calcium-binding protein A4
SCAI	Suppressor of cancer cell invasion
SDS	Sodium dodecyl sulfate
siRNS	Small interfering RNS
SMA	Smooth muscle actin
SWI/SNF	SWItch/Sucrose Non-Fermentable
TBS	Tris-buffered saline

TGF- β	Transforming growth factor beta
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethane
Triton-X	Polyethylene octyl phenyl ether
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WSTF	Williams syndrome transcription factor

1 Bevezetés

1.1 Vesefibrózis jelentősége

A leggyakoribb 21. századi megbetegedések egyike a krónikus vesebetegség. A várható élettartam növekedése, valamint vesekárosodással társuló megbetegedések és elváltozások (cukorbetegség, magasvérnyomás betegség, magas vérsírkoncentráció) végállapotú veseelégtelenség kialakulásához vezethetnek. (Bolignano és mtsai 2014)

A krónikus vesebetegség 2002-ben az egyesült államokbeli National Kidney Foundation által megfogalmazott definíciója alapján “különböző okok miatt létrejövő, minimum 3 hónapja fennálló strukturális és/vagy funkcionális vesekárosodás”. A definíciót a magyar veseegógyászati szakmai szervezetek is elfogadták és honosították.

A világ számos pontján végeztek felmérést a krónikus vesebetegség előfordulásának megállapítására, mindezek alapján a lakosság 10-16%-a tekinthető krónikus vesebetegnek. (Chadban és mtsai 2003, Hallan és mtsai 2006, Coresh és mtsai 2007, Wen és mtsai 2008, Pani és mtsai 2014, Wen és mtsai 2014)

Magyarországra vonatkozóan kevés adat áll rendelkezésre a krónikus vesebetegek számát tekintve, leginkább a dialízisre szoruló páciensek adatai alapján becsülhető a prevalencia. (Kiss és mtsai 2013, Nagy 2013) A dialízis kezelésben részesülő magyar páciensek száma a 1991 és 2015 évek közötti időszakban számottevően emelkedett: 1991-ben összesen mintegy 1900 fő részesült dialízis kezelésben, és 2015-ben összesen 11743 fő részesült. Magyarországon 2015 decemberében 6430 személy számára volt szükség hemodialízis kezelésre. Összességében Magyarországon a hemodialízis prevalencia 2015-ben 643 személy / millió lakos volt. (Kulcsár 2010, Kulcsár 2015)

A veseelégtelenséggel élők számának növekedéséhez társulóan a vesetranszplantáció száma világszerte folyamatosan emelkedik. Magyarországon 1991-ben 160 cadaver vesetranszplantáció volt, a vesetranszplantáció száma 2014-re 341-re emelkedett, amely 2016-ban is közel azonos szinten maradt az éves 307 vesetranszplantációval. A magyarországi vesetranszplantációk számának növekedését magyarázó okok közül elsősorban az Eurotransplant-hoz csatlakozása emelhető ki, amely 2013-ban a teljes jogú tagság elnyerésével vált teljessé. (Langer R 2010, Szelestei 2011)

A krónikus vesebetegek számának folyamatos növekedése miatt a vesekárosodás kialakulásának vizsgálata, a molekuláris és sejtszintű folyamatainak feltárása különösen fontos, és ennek elsődleges célja a vesebetegségek megelőzése. Sajnos jelenleg nem áll rendelkezésre olyan specifikus gyógyszer, amely a károsodott vese struktúráját eredeti állapotába visszaállítaná. Gyógyító eszköztárunkban jelenleg a vesekárosodás morfológiai megjelenéseként látható fibrózis folyamatának lassítását elősegítő gyógyszeres hatóanyagok vannak, amelyek elsősorban vérnyomáscsökkentő hatásúak. Ezen gyógyszerek elsősorban a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer működését gátló hatóanyagok csoportjába tartoznak. A vérnyomáscsökkentő gyógyszerek egyelőre széles spektrumú hatással bírnak, és ennek következtében az esetleges mellékhatások is számottevőek lehetnek. A specifikusabb gyógyszerek kifejlesztéséhez a vesefibrózis folyamatának sokkal pontosabb megértése szükséges, ez alapozhatja meg az eddigieknél célzottabb gyógyszerek kifejlesztését, és a pontos terápia tervezését és alkalmazását.

Munkacsoportunk az elmúlt években a vesefibrózis kialakulásában résztvevő egyes jelátviteli molekulák intracelluláris szerepét vizsgálta, dolgozatomban ezen munkánk eredményeit foglalom össze.

1.2 A tubulointersticiális vesefibrózis morfológiája

A vesében kötőszövetfelszaporodást és ezáltal vesefunkció csökkenését előidéző betegségek közül kiemelkedően fontosak a cukorbetegség, a magasvérnyomásbetegség, gyulladásos vesebetegedések, valamint mindazon kóroki tényezők, amelyek a vesében a glomerulusokat, a tubulusokat vagy az érkepleteket károsítják. Ezen folyamat eredményeként a glomerulusok és a tubulusok helyén kötőszövet jelenik meg, és az ehhez szükséges kötőszövet-termelő sejtes elemek számának növekedése is megfigyelhető. (Zeisberg és Neilson 2010, Lopez-Hernandez és Lopez-Novoa 2012)

Továbbra is nyitott kérdés, hogy a vesekárosodás során mely folyamatok vezetnek “adaptív”, “minimális hegesedéssel” járó, normálshoz hasonló mennyiségű intersticiális kötőszövetgyülemmel jellemezhető gyulladásához, és mely esetekben alakul ki “maladaptív” folyamat, amelynek során jelentős kötőszövetfelszaporodás alakul ki az intersticiumban, és ezáltal a vese szöveti állományának irreverzibilis károsodása következik be. (Eddy 2014)

Az ép és fibrotikus vesében az intersticiális kötőszövet mennyiségének dinamikus egyensúlyát számos tényező befolyásolja. Az ép vesében az intersticium I, III, V, VI, VII, XV-ös kollagének mellett szulfatált és nem-szulfatált proteoglikánokat, glikoproteineket és poliszacharidokat tartalmaz. A fibrózis korai fázisában a kollagén I és kollagén III mennyisége emelkedik meg. Mindezek mellett a fibronectin, tenascin-C, valamint bazális membrán komponensek (IV-es és V-ös típusú kollagén fragmentumok, integrinek, laminin, nidogen, heparin szulfát proteoglikán), aggrecan, hyaluronan, versican, decorin, biglycan, fibromodulin, osteonectin, thrombospondin, vitronectin, hensin mennyisége is megemelkedik és különböző fibrillinek is kimutathatóvá válnak, és mennyiségük folyamatosan változik. (Zeisberg és Neilson 2010, Eddy 2014, Genovese és mtsai 2014)

A vesefibrózis folyamatának első, morfológiailag is észlelhető lépésében a tubuláris epitélisejtek ellapulása és apikális kefeszegélyük egyenetlenné válása vagy eltűnése látható, amelyhez a tubulus lumen tágulata és a tubuláris bazális membrán megvastagodása társul. Ezt követően a tubulusok közötti intersticiális térben kötőszövet-felszaporodás figyelhető meg. A felszaporodó intersticiális kötőszövet és a megvastagodó tubuláris bazális membrán a peritubuláris kapillárisokból tubuláris epitélisejtek irányába irányuló oxigén diffúziót gátolja, ezért a tubuláris epitélisejtek a hypoxiás károsodás miatt ellapulnak, és tubuláris atrófia alakul ki. A fibrotikus vese mikroszkópos szövettani vizsgálata során glomeruloszklerózis, tubuláris atrófia, intersticiális fibrózis és arterioszklerózis látható, valamint megemelkedett számú intersticiális kötőszöveti sejt észlelhető. A vesefunkció károsodást elősegíti a vérellátás csökkenése, amelynek hátterében két komponens is számottevő hatású. Az egyik komponens az érfal-megvastagodás és érlumen-szűkület, amely a glomerulusok kiegyensúlyozott vérellátásának csökkenését idézheti elő. A másik komponens a glomeruláris kapilláris kacsok lumenének szűkülete vagy elzáródása által előidézett véráram csökkenés, amelynek következtében az efferens arteriolán keresztül a peritubuláris kapillárisokban áramló vér mennyisége csökken, és ezáltal a tubuláris epitélisejtek oxigénellátása zavart szenved. Ennek következtében a peritubuláris kapillárisok bazális membránjának megvastagodása következik be, amely a tubuláris epitélisejtek további oxigénhiányos károsodásához vezet. Mindezen vérellátási károsodási folyamatok a vese alapstruktúrájának folyamatos roncsolódásához vezetnek.

Korai kísérletes eredmények alapján a vesefibrózis mechanizmusát más belszervek fibrotikus folyamataihoz hasonlónak gondolták. A vese morfológiai vizsgálatához nagy lökést adott a diagnosztikus vesebiopsziás minták tanulmányozása, és ennek következtében az intersticiális fibrózis különböző formáit írták le:

1. Kiterjedt hegyszövet veseállomány-károsodással, amely elsősorban infarktus vagy pyelonefritisz esetén alakul ki. A szövettani kép nagyszámú nefron károsodása következtében bekövetkezett válaszreakciónak tekinthető.
2. Kicsiny, helyenként diffúz, másutt fokális kötőszövet felszaporodással járó tubulointersticiális fibrózis. Ezen szöveti kép egy-egy sérült nefronhoz köthető, és a fibrózis a glomerulus, a tubulus vagy az ezeket ellátó érstruktúra sérülése folytán alakul ki. (Farris és mtsai 2011, Farris és Colvin 2012)

A vesefunkció romlásának magyarázatát kutatva a morfológiai eltérések és a funkcióbeli változások közötti kapcsolat meghatározása során számos tényező felmerült. Számos tanulmány a vesefunkciót jellemző glomeruláris filtrációs ráta (GFR) és a morfológiai eltérést jelző tubulointersticiális fibrózis mértéke között mutatott ki összefüggést. A vesekárosodás okainak magyarázatát kutatva ezen összefüggés irányította a figyelmet a tubulointersticiális fibrózis jelentőségére. (Risdon és mtsai 1968, Schainuck és mtsai 1970, Striker és mtsai 1970, Servais és mtsai 2011)

A vesefunkció változása és az annak megfeleltethető szövettani eltérések vizsgálata az utóbbi évtizedekben a saját vese megbetegedései mellett a transzplantált vese esetében is növekvő számú adatot eredményezett. Az újabb vizsgálatok a transzplantált vese túlélése szempontjából az intimális érfalmegvastagodás, és arteriola hialinózis mellett az intersticiális fibrózis prognosztikai szerepét emelték ki a transzplantált vese túlélése szempontjából. (Kamar és mtsai 2012, Lee és mtsai 2016)

A progresszív tubulointersticiális fibrózis kialakulása során a megnövekedett számú intersticiális sejt az extracelluláris mátrix (ECM) termeléséhez szükséges fehérjéket expresszálja, illetve az intersticiális sejtek az ECM termelésre alkalmas sejtekre jellemző fehérje markereket expresszálnak. Ezen folyamat központi sejtes eleme a myofibroblaszt, amelynek kialakulása és funkciója az utóbbi években a vesekutatás egyik központi kérdésévé vált. (Grande és Lopez-Novoa 2009, Grgic és mtsai 2012)

1.3 A tubulointersticiális fibrózis sejtes elemei

A myofibroblasztok legelső leírására 1972-ben bőr szövetminta elektronmikroszkópos vizsgálata során került sor. A vizsgálat során a sejtekben kontraktilis stressz-fehérjék, aktin citoszkeleton és durva endoplazmás reticulum volt látható, valamint megfigyelhető volt a citoplazmában a lizoszómák hiánya is. (Gabbiani és Majno 1972)

A későbbi vizsgálatok ezen morfológiai jellegzetességeket megerősítően a myofibroblasztokat kerek sejtmaggal jellemezték. A myofibroblasztokban a citoplazma közepes szélességű, és benne az α -simaizom aktin (SMA) mellett vimentin, fibronektin, S100A4 (vagy más néven Fibroblaszt specifikus protein = FSP-1), Heat shock protein 47 (HSP47) fehérje is kimutatható. (Le Hir és mtsai 2005, Meran és Steadman 2011, Kramann és mtsai 2013)

A myofibroblasztok jeletőségét vizsgálva kimutatható volt az intersticiális myofibroblasztok száma és a vesefibrózis súlyossága közötti, valamint a myofibroblasztok száma és a veseelégtelenség kialakulásának sebessége közötti összefüggés. (Qi és mtsai 2006) Humán vesebiopsziás szövetminták vizsgálatakor megemelkedett számú myofibroblaszt volt kimutatható diabéteszes nefropátia, IgA nefropátia, lupusz nefritisz esetében, és a transzplantált vesékben kimutatható krónikus allograft nefropátia során is. Állatkísérletes modellek vizsgálatakor a vesében egyoldali uréter obstrukciós kísérletekben egérben és patkányban volt emelkedett számú myofibroblaszt kimutatható. (Grande és Lopez-Novoa 2009)

A myofibroblasztok eredetét kutatva nagyszámú kísérletes adat született, ennek során felvetették epitélsejt, fibroblaszt, pericita, perivaszkularis sejt, valamint endotél sejt myofibroblaszt-jellegű mezenchymális típusú sejtté alakulás lehetőségét is. (Farris és Colvin 2012, Kramann és mtsai 2013, Nakagawa és Duffield 2013)

A vesefibrózis során megjelenő, jelentős számú intersticiális myofibroblasztokat hosszú ideig az epitél sejtekből származtathatóként jelölték meg. Ezen elmélet alapján a vesében a szövetkárosodást előidéző hatások válaszreakciójaként a tubuláris epitél sejtek az epiteliális-mezenchymális tranzíció (EMT) folyamata során myofibroblasztokká alakulnak. A korábbi állatkísérletes modellek alapján megállapítható volt, hogy a myofibroblasztok akár 40%-a is a tubuláris epitélsejtekből származik. (Iwano és mtsai 2002)

További in vivo megfigyelések alapján az endotél sejtek endotél-mezenchymális tranzícióját is leírták, és ennek következtében a myofibroblasztok akár 40%-a jöhet létre ezen endotél-mezenchymális tranzíció során. (Zeisberg és mtsai 2008)

LeBleu és munkatársai kísérletes egérmodellben azt igazolták, hogy a myofibroblasztok mintegy 50%-a proliferáló fibroblasztokból származik. A maradék, nem-proliferáló myofibroblasztok 35%-ban csontvelői eredetű sejtekből differenciálódnak, 10%-ban endoteliális-mezenchymális tranzíció útján, és 5%-ban epiteliális-mezenchymális tranzíció útján képződtek. (LeBleu és mtsai 2013)

Ugyanakkor a legújabb megfigyelések alapján az EMT szerepe nemcsak az arányaiban kisebb számú myofibroblaszt létrejöttében kiemelkedő. A vizsgálati eredmények arra utalnak, hogy az úgynevezett parciális EMT során olyan szignálmolekulák kerülhetnek az intersticiumba, amelyek elengedhetetlenek az egyéb sejtforrásból kialakuló myofibroblasztok létrejöttéhez is. (Grande és mtsai 2015)

Mindezekhez hasonlóan Humphreys és Asada is elsősorban a már intersticiumban meglevő mezenchymális sejteket tartják a myofibroblasztok “ősének”, ugyanakkor a myofibroblasztok eredetének pontos tisztázásához még további vizsgálatokra van szükség. (Humphreys és mtsai 2010, Asada és mtsai 2011, Eddy 2013, Nakagawa és Duffield 2013, Ballhause és mtsai 2014)

Mack és Yanagita 2014-es dolgozatában összegyűjtött adatok alapján a fibrózis kialakulása során a myofibroblasztok aránya a sejtes elemek között 0% és 90% közötti volt. (Mack és Yanagita 2014)

A vesében az energiaszolgáltatás döntő részéért felelős tubuláris epitélisejtek fiziológiai körülmények között az ECM termelésében közvetlenül nem vesznek részt. Ugyanakkor károsító tényezők hatására az epitélisejtek aktiválódhatnak, és eredeti funkciójukat elveszíthetik, bennük mezenchymális jellegzetességek jelenhetnek meg. Az epiteliális-mezenchymális tranzíció (EMT) során az aktivált epitélisejtek elveszítik az epiteliális tulajdonságaikat (apiko-bazális polaritás, kompakt sejthalak, sejt-sejt közötti kapcsolatok), valamint az epiteliális sejtekre jellemző intracelulláris molekuláris markereiket. Az elmúlt években a vesében nagyszámú EMT-re jellemző marker kísérletes vizsgálata történt, amelyek részben az epiteliális markerek mennyiségének csökkenését (pl. occludin, claudinok, zonula occludens-1, E-cadherin, P-cadherin, cytokeratin 18) igazolták. Ezzel párhuzamosan mezenchymális morfológiai

jellegzetességek (megnyúlt sejthalak, megnövekedet motilitás és kontraktilitás) valamint mezenchymális molekuláris markerek (vimentin, α -SMA, N-cadherin, OB-cadherin) megjelenése észlelhető. (Quaggin és Kapus 2011, Loeffler és Wolf 2015)

Egér kísérleti modellben az EMT során epiteliális sejtek a bazális membránon ájtutva az intersticiumban jelentek meg, azonban humán kísérletes eredményekből egyelőre csak kevés adat áll rendelkezésre. (Zeisberg és Neilson 2009, Inoue és mtsai 2014) Oldfield és munkatársai patkány és humán mintákon végzett immunhisztokémiai vizsgálatai krónikusan fennálló diabéteszes nefropátia során a patkány vesében α -SMA-t mutattak ki mintegy 5%-nyi intakt epitelsejt citoplazmájában. Humán vizsgálatokban 15 cukorbeteg szövetmintájában ugyancsak kimutatható volt az epitelsejtekben α -SMA. (Oldfield és mtsai 2001)

Mandache és munkatársai immunfluoreszens és elektronmikroszkópos vizsgálatokkal diabéteszes nefropátiában az intersticiumban a tubuláris bazális membránhoz közel mutattak ki myoepiteliális jellegzetességű sejteket. (Mandache és mtsai 2011)

A károsodott epitelsejtek további sajátosságai, hogy exoszomákat bocsátanak a környezetükbe, amelyek az intersticiális fibroblasztokban proliferációt, valamint α -SMA expressziót, F-aktin expressziót, és I-es típusú kollagén termelődést indukálnak. Ezen hormonális hatás fő mediátora Borges és munkacsoportjának eredményei alapján az exoszomákban található Transzformáló Növekedési Faktor- β 1 (TGF- β 1) mRNS, amelyet a fibroblasztok autofágia/fagocitózis útján vettek fel, és ezáltal a fibroblasztok nagy sebességgel képesek TGF- β 1 fehérjét termelni. A TGF- β 1 termelés a kísérletek során többek között kis interferáló siRNS kezeléssel gátolható volt. (Borges és mtsai 2013)

Tekintettel arra, hogy az élettani működését még megtartott, ugyanakkor már károsodás által érintett, azaz aktivált epitelsejtek a myofibroblasztoktól eltérő fehérje-expressziós tulajdonságokat mutathatnak, ezért az aktivált epitelsejtek megnevezésére Mengel és munkatársai az “epiteliális-mezenchymális fenotípus” megnevezést javasolják. Más közleményekben az “epiteliális-mezenchymális plaszticitás” fogalma jelent meg azon sejtekre értendően, amelyekben az epiteliális és mezenchymális fehérjék is kimutathatóak. (Mengel és mtsai 2012, Cao és mtsai 2017)

Vesekárosodás során a tubuláris epitelsejtek regenerációs képessége hosszú ideig megmarad, ilyenkor az epitelsejtek osztódásra képesek, és ezáltal a tubulusok

alapstruktúrája továbbra is megőrzött marad. A vesefibrózis progressziójával egy eddig még pontosan meg nem határozott időpontban azonban az epitélisejtek regenerációs képessége már nem elegendő a hiányzó sejtek pótlására, emiatt az epitélisejtekben apoptózis, majd sejthalál következhet be. Ezen időpont meghatározása jelen tudásunk alapján még nem lehetséges, de azt már tudjuk, hogy az epitélisejtek károsodásának folyamatát nagy számú citokin, sejtciklust vezérlő fehérje és oxidatív stressz-homeosztázisért felelős faktor szabályozza. (Eddy 2014)

Az előzőekben részletezett sokrétű folyamatok arra utalnak, hogy a sejtek epiteliális és mezenchymális állapota közötti folyamat érzékenyen szabályozott, többlépcsős, számos transzkripciós faktort, epigenetikai génexpressziós regulátor hatást és molekuláris mechanizmust foglal magába. A “hibrid” fenotípusú sejtek tehát az epiteliális állapot és mezenchymális állapot között vannak, és külső hatásra valamelyik állapotba plasztikusan átalakulhatnak. Grande és munkatársai egér kísérletes modellben a Snail1 fehérje szerepét vizsgálták az EMT és vesefibrózis folyamatában. Ezen fehérje a vese embriogenezise során az epitélisejtek prekurzoraiban expresszálódik, majd a kifejlett epitélisejtekben aktivitása alacsony szintre csökken. A vesefibrózist elindító folyamatok között ezen fehérje aktivációja is számottevő, azonban önmagában a fehérje mennyiségének megnövekedése csak egy “részleges” EMT folyamathoz vezet az egér vesében. A Snail1 fehérje mennyiségének növekedésével járó folyamat során az epitélisejtekben megjelentek ugyan mezenchymális jellegű fehérjék, ugyanakkor az epitélisejtek még nem veszítik el polaritásukat, és a vese tubulusok integritása is megőrzött. A Snail1 fehérje inaktiválását követően a szövettani vizsgálatok minimális mennyiségű intersticiális kötőszövetet mutattak ki, amely alapján a szerzők felvetették annak lehetőségét, hogy a Snail1 fehérje működésének szabályozásával az eddig egyirányúnak tekintett fibrózis folyamatát meggátolva esetlegesen a reverzibilis folyamatok is elindíthatóak lennének. Lovisa és munkatársai vizsgálataik során azt is kimutatták, hogy a Snail1 fehérje gátlása a sejtciklus befolyásolása révén időt enged az epitélisejtek ezen köztes állapotában egyes regeneratív folyamatok elindításához, és ez az idő segíthet az intersticiális fibrózishoz vezető visszafordíthatatlan folyamatok aktiválódásának megelőzésében. Ennek következtében az EMT során felszabaduló és intersticiális fibrózist előidéző citokinek expressziója és epitélisejtekből kiáramlása sem következett be. Mindezen megfigyelések előrevetítik azt a lehetőséget, hogy a vese

fibrózis során manifesztálódó EMT három potenciális mechanizmus révén járul hozzá a myofibroblasztok kialakulásához és a vesefibrózis progressiójához:

1. Az EMT hozzájárul a myofibroblaszt sejtpopuláció számának növekedéséhez, mivel a myofibroblasztok mintegy 5%-a epitel eredetű lehet
2. A Snail1 mediálta részleges EMT hozzájárulhat egy, az epitel sejtekből kiinduló celluláris szabályozó mechanizmushoz, amely révén az EMT a nem epitel kompartmentet aktiválja
3. Az EMT egy „fine tuning” lehetőséget is jelenthet a regeneráció és a kóros gyulladás, azaz hegesedés közötti folyamatban. (Grande és mtsai 2015, Lovisa és mtsai 2015, De Chiara és Crean 2016, Lovisa és mtsai 2016)

Az intersticiális fibroblasztok a vese kötőszövetes vázának kialakításában játszanak szerepet, többek között kollagén I és kollagén III termelésben vesznek részt. (Lin és mtsai 2008) Szegényes specifikus jellegzetességük miatt morfológiailag nehéz elkülöníteni őket más intersticiális sejtektől. Eddigi ismereteink alapján az intersticiális fibroblasztok fejlett durva endoplazmás retikulummal és F-aktin tartalmú citoszkeletonnal rendelkeznek, valamint sejtmembránhoz kötött ekto 5'-nukleotidáz fehérjét expresszálnak. (Kaissling és Le Hir 2008, Boor és mtsai 2010, Kaissling és mtsai 2013) A vesekárosodás során a fibroblasztokban myofibroblasztokra jellemző fehérjék expressziója is kimutatható. (Fujigaki és mtsai 2005)

A fibrociták a fibroblasztoktól különböző, ECM termelő sejteknek tekinthetőek. A fibrocitákat jellemző molekuláris markerek között hemopoetikus (CD45) és strómális fehérjék termelése (I-es típusú kollagén) is kimutatható. A fibrociták a vérkeringésben is kimutathatóak kis számban, azonban ennek jelentősége egyelőre kevésbé ismert. (Wada és mtsai 2011, Pan és mtsai 2014)

A gyulladásos sejtek közül a CD4 fehérjét expresszáló limfociták, CD11 fehérjét expresszáló monociták/makrofágok, dentritikus sejtek is kimutathatóak az intersticiális fibrózis folyamatában. (Farris és Colvin 2012) A krónikus vesekárosodás során az intersticiumban a makrofágok száma fordított arányosságot mutat a vese túlélési idejével. Ezen makrofágok nagyszámú citokint, fehérjét, enzimet és azok inhibitorait termelhetik. (Yu és mtsai 2010) Kísérletes modellben a vesesérülésre adott válasz elején a makrofágok számának csökkentése a vesefibrózis mértékét is enyhítette, azonban a

szövetsérülés késői fázisában a makrofágok számának csökkenésének hatására a vesefibrózis kifejezettebb volt. (Duffield és mtsai 2005)

Újabban a számos szervben előforduló perivaszkuláris mezenchymális sejtek (vesében periciták) myofibroblasztta való transzdifferentiációs modelljét is leírták, azonban az eddigi eredmények alapján a periciták nem tekinthetők elsődleges myofibroblaszt forrásnak. (Campanholle és mtsai 2013, Nakagawa és Duffield 2013)

Kísérletes tubulointersticiális fibrózis során az előzőekben leírt EMT folyamatához hasonlóan az endotélsejtek is képesek mezenchymális fenotípusú sejtekké alakulni, ezen folyamatot endoteliális-mezenchymális tranzíciónak (EndMT) nevezzük. Az endotél sejtek az epitel sejtekhez hasonlóan apikális-bazolaterális irányú polarizáltsággal rendelkeznek, egymáshoz tight junction kapcsolattal és más adhézións molekulákkal kapcsolódnak. Az EndMT során az endotél sejtekre jellemző markerek (VE-Cadherin, CD31, von Willebrand faktor, némely endotél-sejttípusban citokeratinok) mellett mezenchymális (fibroblaszt jellegű) markerek (α -SMA, FSP-1, N-cadherin, fibronectin, vimentin, nestin, kollagén I, kollagén III, PDGFR- β , MMP-2, MMP-9) megjelenése látható. (Zeisberg és mtsai 2008, Piera-Velazquez és mtsai 2011, Piera-Velazquez és Jimenez 2012, He és mtsai 2013)

A károsodott vesében a fibrózis folyamata mellett angiogenezis és lymphangiogenezis is leírásra került már. Az angiogenezis a fibrotikus veseszövetben az endotél sejtek számának növekedéséhez is vezet. Az angiogenezis folyamatában a Vaszkuláris Endoteliális Növekedési Faktor-C (VEGF-C) központi szerepet játszik, és az eddigi vizsgálatok alapján a folyamatot egy VEGFR gátló hatóanyag (sirolimus) gátolja. (Sakamoto és mtsai 2009, Ozdemir és mtsai 2011)

Az EMT-re jellemző fehérjeexpressziós változások klinikai relevanciájának eredményei még viszonylag szegényesek. A szakirodalomban mindössze kevés számú klinikai vizsgálat adatai lelhetőek fel. A legutóbbiak egyike a francia CERTITEM vizsgálat, amelyben transzplantált vesék fibrotikus folyamatait vizsgálták. Ennek során úgynevezett EMT-markereket használtak, és ezek mennyiségének változását követték, majd hasonlították össze a vesefunkció paramétereivel. A vizsgálatban használt EMT-markerek a vimentin expresszió, β -catenin sejtmembrán-citoplazma transzlokáció, illetve a Snai11 fehérje expresszió változása voltak. (Rostaing és mtsai 2015)

1.4 Humorális elemek a tubulointersticiális fibrózisban

A tubulointersticiális fibrózis progressziójában és az ECM mennyiségének növekedésében a renin-angiotenzin rendszer elemeinek és a TGF- β szupercsalád tagjainak szerepe, valamint nagyszámú egyéb növekedési faktor (többek között VEGF, PDGF- β) részvétele igazolódott eddig.

1.4.1 Renin-angiotenzin rendszer

A renin-angiotenzin rendszer komponenseinek vérnyomást és folyadékháztartást szabályozó klasszikus hatásai mellett az angiotenzin II-nek (AngII) növekedési faktorszerű hatásai is vannak, amelynek részeként mitogén aktiválta protein kinázok (MAPK) aktivációja, tirozin foszforiláció és ezáltal különböző gének transzkripció aktivitásának változása is megfigyelhető. Ezen folyamatok közül az elmúlt években számos intracelluláris jelátviteli út azonosításában munkacsoportunk is részt vett. (Huszár és mtsai 2001, Terebessy és mtsai 2004).

Az AngII receptorok 1-es és 2-es típusa (AT₁R és AT₂R) a 7 transzmembrán, G-fehérje kapcsolt fehérjék csoportjába tartoznak. Az AngII elsődleges, fibrotikus hatása az AT₁R-on keresztül valósul meg. Az AT₁R domináns intracelluláris jelátviteli útja az intracelluláris Ca²⁺ koncentráció megemelése során indul, amely aktiválja a foszfolipáz C (PLC), foszfolipáz D (PLD) enzimeket, és az L-típusú Ca-csatornát valamint a Rho kinázt is. Mindezek mellett az AngII számos citoplazmatikus tirozin kináz aktiválódást is elősegíti, ilyenek például például a Pyk2, c-Src, Tyk, FAK és a Jak2 kinázok. Az AT₁R aktiválódását követően egyéb receptor tirozin kinázok (EGFR, PDGFR, IGFR) is transzaktiválódhatnak, amelyek további specifikus jelátviteli utakat indíthatnak a sejtmag irányába. (Yin és mtsai 2003, Hunyady és Catt 2006, Ruster és Wolf 2011) Ismert az is, hogy az AT₁R aktiválódását követően a G-fehérjétől függetlenül további jelátviteli utak is aktiválódnak, ezek között van a β -arrestin útvonal, valamint és egyéb tirozin kinázok (JAK/STAT, Cdc42/JNK, Src/Ras/ERK). (Hunyady és Catt 2006)

Az AngII által elindított intracelluláris jelátviteli útvonalak hatására fibroblasztokban sejtproliferációt előidéző fehérjék termelődnek és aktiválódnak. (Kagami és mtsai 1994) Az AngII emellett az ECM mennyiségének növekedéséhez is hozzájárul, részben az ECM termelésének fokozása, részben az ECM lebontásáért felelős enzimek

aktivitásának csökkentése útján. (Eddy 2005, Campanholle és mtsai 2013) Vesefibrózisban az ECM lebontásáért felelős szerin proteáz gátlók közül a Plazminogén Aktivátor Inhibitor-1 (PAI-1) mennyiségének növekedése figyelhető meg. (Eddy 2009) Az AngII hasítási termékei (Angiotenzin III és Angiotenzin IV) hasonlóképpen intracellularis jelátviteli utakat indítanak el további receptorokon keresztül. (Li és mtsai 1995) Az AngII egyik hasított termékének, az AngIV-nek (=Ang(3-8)) saját receptora van (AT₄R). Az AngIV hormonális hatása döntő mértékben ellentétes az AngII hatásával. (Moeller és mtsai 1999, Mustafa és mtsai 2001, Chai és mtsai 2004) Ugyanakkor érdemes megjegyezni, hogy az AngIV az AT₁R-on keresztül is képes hatást kifejteni, ennek fiziológiai jelentősége egyelőre még nem ismert. (Yang és mtsai 2010)

1.4.2 Transzformáló Növekedési Faktor - béta (TGF- β)

A TGF- β család több mint 30 taggal rendelkezik, melyek közé tartozik a TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, activinok, nodal fehérjék, Anti-Müllerian Hormon (AMH), Bone Morphogenic Protein-ek (BMP), Növekedést és Differenciálódást Elősegítő Faktor (Growth Differentiation Factor = GDF), Glial-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) és számos egyéb jelátviteli molekula. (Piek és mtsai 1999, Weiss és Attisano 2013)

Különböző sejtek képesek TGF- β termelésére. Sérülés, hegesedés, gyulladás esetében különösen nagy mennyiségben termelődik parenchymalis sejtekben a vesében, tüdőben, méhlepényben és csontban is. Emellett az immunrendszerhez tartozó sejtek is képesek termelni, például a limfociták és a makrofágok, illetve jelentős mennyiségű TGF- β -t termelhetnek a trombociták is. (Branton és Kopp 1999)

A TGF- β család tagjai egy hosszabb prekursor fehérje formájában expresszálódnak, majd a sejten belüli becsomagolást és az N-terminális régió lehasadását követően nyerik el „érett” formájukat. A TGF- β a termelődést követően intracellulárisan a Latency-Associated Proteinhez (LAP) kötődik, majd ez a fehérje-komplex a Latent TGF- β Binding Proteinhez (LTBP) kapcsolódva inaktív formában van jelen a vezikulákban. Ez a molekula-komplex szekretálódik a sejtől, és az ECM komponenseihez kapcsolódva „tárolódik”. (Huang és mtsai 2008, Huang és mtsai 2008, Weiss és Attisano 2013)

A TGF- β az inaktív formából enzimatis emésztés vagy egyéb hatásra az LTBP-hez kapcsolt formából felszabadulva dimer formát képez, majd adimer-ligand a heteromer és homomer párokat alkotó I-es és II-es típusú TGF- β receptorok (TGFB β R) extracelluláris doménjéhez kötődik. A TGF- β szupercsalád receptorai intracellulárisan szerin/treonin kináz aktivitásúak. Gerincesekben az I-es típusú receptorcsalád 7 tagból, a II-es típusú receptorcsalád 5 tagból áll, és a ligand-receptor dimerek affinitása elérő intenzitású intracelluláris enzimaktivitást indít. A ligand-receptor komplexekhez további koreceptorok is kapcsolódhatnak, amelyek az intracelluláris jelátviteli utak aktivitását tovább befolyásolhatják. (Weiss és Attisano 2013)

A TGF- β receptorcsalád széleskörű ligand- és receptor diverzitása ellenére emberben funkció és intracelluláris jelátviteli utak tekintetében a TGF- β I-es receptorcsalád két nagy csoportba sorolható, a TGF- β receptor (TGFB β R) és a BMP receptorok (BMPR) családjába. A TGFB β R és BMPR családok is két jelentős intracelluláris jelátviteli utat aktiválnak.

A TGF- β intracelluláris jelátviteli útjának egyik ágában a Smad fehérjék közvetlenül a transzmembrán receptortól a sejtmagba közvetítenek jelet. Ezen jelátviteli ágat Smad dependens TGF- β jelátviteli útnak hívjuk.

A Smad fehérje-család konzervatív szerkezetet mutató fehérjékből áll, amelyek a legyekben és férgekben leírt SMA és MAD fehérjékhez hasonló szerkezetet mutatnak. Gerincesekben 8 különböző Smad fehérje ismert, és 3 funkcionális csoportra oszthatók:

1. receptor regulálta Smad-ok (R-Smad = Smad1, 2, 3, 5, és 9)
 - a. TGFB β R indukálta Smad (Smad 2 és 3)
 - b. BMPR indukálta Smad (Smad1, 5, és 9)
2. közös Smad mediátor (Co-Smad = Smad4)
3. gátló Smad-ok (I-Smad = Smad6 és 7).

A típusos TGFB β R aktivációs út kezdetére jellemző, hogy a TGF- β fehérje az állandóan aktív szerin-treonin kináz TGFB β RII-höz kapcsolódik, majd a TGF- β /TGFB β RII fehérje-komplex a TGFB β RI-et foszforilálja.

A TGFB β RI foszforilációját követően az R-Smad is foszforilálódik, majd az R-Smad heteromer komplexet alkot a Co-Smad-dal (Smad4), és ez a komplex a sejtmagba

transzlokálódik. (Moustakas és Heldin 2009, Massague 2012, Shimmi és Newfeld 2013).

A Smad fehérjék folyamatosan transzportálódnak a citoplazma és a sejtmag között. A TGF β R aktiváció hatására a sejtmagban kimutatható Smad fehérjék mennyisége megnő. (Hill 2009) Az R-Smad és a Co-Smad fehérjék közvetlenül képesek a DNS-hez kötődni, amellyel génszabályozó funkciót képesek betölteni. (Shi és mtsai 1998, Jayaraman és Massague 2000) A Smad fehérjék DNS-hez kötődése azonban kis affinitású, így a stabil kapcsolat kialakítása céljából további segítő fehérjék részvételére van szükség. Ezen folyamat során az R-Smad keresi meg a specifikus DNS szekvenciát, és az ehhez kapcsolódó Co-Smad segíti elő a transzkripciót. (Feng és Derynck 2005, Moustakas és Heldin 2009)

A gátló Smad-ok (I-Smad) termelődésének sebessége ugyancsak megnő TGF- β hatására, amelynek elsődleges célja a Smad jelátviteli utak túlzott aktiválódásának megakadályozása. Egér in vivo kísérletekben a Smad7 gén kiütés hatására kifejezett vesefibrózis alakult ki, míg különböző állatmodellekben génterápia alkalmazásakor a Smad7 fehérje túltermelése csökkentette a vesefibrózis mértékét. (Meng és mtsai 2013)

Bár a TGF- β 1 intracelluláris jelátviteli útja meglehetősen konzervatív, ugyanakkor számos Smad-független utat is leírtak, amelyekben elsősorban az AngII jelátviteli útjában is fontos szerepet játszó kis GTP-áz aktivitású fehérjék, valamint a MAPK-ok és PI3K-ok vesznek részt. (Mu és mtsai 2012) A TGF- β 1 aktiválja a kis G-fehérjék közül a Rho kis GTP-ázt különböző sejttypusokban, emellett a TGF- β 1 képes aktiválni a MAPK útvonalat is (ERK, JNK, P38=MAPK14) azáltal, hogy nem csak szerin/treonin, hanem tirozin-kináz aktivitással is rendelkezik. (Kardassis és mtsai 2009, Zhang 2009, Papadimitriou és mtsai 2011, Mu és mtsai 2012)

A TGF- β receptor szupercsaládhoz tartozik a Bone Morphogenic Protein (BMP) receptorcsalád (BMPR) is. Ezen receptorok ugyancsak hetero- és homodimerek kialakítására képesek, és a TGF β R-hoz hasonlóan a BMP ligand kötődését követően Smad jelátviteli út aktiválását idézik elő. (He és mtsai 2013, Meng és mtsai 2013)

A TGF- β 1 széleskörű szabályozó funkciójára jellemző, hogy az ECM homeosztázisáért felelős fehérjék közül a TGF- β 1 hatással van az ECM elbontásáért felelős mátrix metalloproteinázokra (MMP) is. A vesében TGF- β 1 hatására a MMP2 és MMP9 mennyisége is megemelkedik, mely hatás az EMT folyamatához is szükséges.

Kísérletes sejtmodellben kimutatható volt, hogy a TGF- β 1-gyel ellentétes hatást kifejtő BMP7 jelenlétében csökkent a TGF- β által indukált PAI-1 fehérje termelődés. (Wang és Hirschberg 2003, Meng és mtsai 2013, Zhao és mtsai 2013)

1.4.3 Az AngII és TGF- β 1 közötti kapcsolat jellemzése

Az AngII és a TGF- β 1 egymást erősítő hatására vonatkozólag számos jól ismert adattal rendelkezünk. A legelső vizsgálatok során tubuláris epitél sejt kultúrában igazolódott, hogy az AngII növeli a TGF- β 1 expresszióját, valamint a TGF β R2 mennyiségét is. (Wolf és mtsai 1993, Wolf és mtsai 1995, Wolf 1998, Wolf és mtsai 1999) További vizsgálatok során bebizonyították azt is, hogy az AngII intracelluláris jelátviteli útjai közül a p38 és JNK enzimek aktiválódása a thrombospondin-1 termelődését növelve az LTBP-ből új TGF- β 1 felszabadulását segíti elő. (Naito és mtsai 2004)

Mindezek mellett érdekes sejtekben végzett vizsgálatok alapján Rodriguez-Vita munkacsoportja igazolta, hogy AngII a TGF- β 1-től függetlenül is képes aktiválni a Smad jelátviteli utakat. (Rodriguez-Vita és mtsai 2005) Ugyanezen munkacsoport későbbi kísérleteiben azt is demonstrálta, hogy EMT-ben az AngII képes a Smad jelátviteli utat is aktiválni. (Carvajal és mtsai 2008) Az aktiváló és gátló hatások egyensúlyának fontosságát demonstrálható kísérletes adattal is, amelyben az AngII intracelluláris jelátviteli útjában fontos ERK-MAPK által bekövetkező R-Smad foszforiláció gátolja a R-Smad C-terminalis végének aktivációját, és ezáltal a Smad jelátviteli úton is gátló hatás észlelhető. (Kretschmar és mtsai 1999)

Az AngII és TGF- β 1 által indukált és szorosan összefonódó jelátviteli utakat számos, nem közvetlenül a renin-angiotenzin rendszer befolyásolására kifejlesztett gyógyszer is képes befolyásolni. Példaként említhető, hogy a modern gyógyászatban széles körben használt, koleszterin vérbeli koncentrációját csökkentő statin típusú hatóanyagok is gátolják a TGF- β 1-től független AngII indukálta Smad jelátviteli utat. (Rodrigues Diez és mtsai 2010)

1.4.4 További hormonális faktorok tubulointersticiális fibrózisban

A vese normális vérellátásában szerepet játszó fehérjék közül a Connective Tissue Growth Factor (CTGF) cisztin-gazdag moduláris fehérje. A CTGF jelátviteli útjában

integrinek, növekedési faktorok és morphogén fehérjék is részt vesznek. Élettani körülmények között a vesében a podociták és periciták vesznek részt a CTGF termelésében. A CTGF fehérje túltermelődése figyelhető meg diabéteszes nefropátiában és krónikus allograft nefropátiában is. A CTGF fontos szerepet játszik az érképződés folyamatában, valamint a keringési rendszer egyensúlyának fenntartásában és az egyedfejlődésben is. A kapillárisok alapszerkezetének sejtes elemei közül a periciták CTGF hatására migrálnak, és myofibroblaszt fenotípust eredményező fehérjeexpressziós változások következnek be. A CTGF mennyisége TGF- β 1 és TGF- β 2 hatására is emelkedik, ezen folyamat intracelluláris jelátvitelében a MAPK mellett a PKC és a Smad3 fehérjék is fontos szerepet játszanak. (He és mtsai 2013, Nakagawa és Duffield 2013)

A korábbiakban említett VEGF receptora, a VEGFR2 a vesében az endotél sejtekben mutatható ki, és többek között a vérárvadási rendszer kiegyensúlyozott működéséért felelős. A VEGF deléció következtében a glomerulus struktúrája destabilizálódik, mikrotrombusok jelennek meg a glomeruláris kapillárisok lumenében. A VEGFR2 aktiválódás hatására az intersticiális vesefibrózis progressziója lassul. Mindezen eredmények az endotélsejtek normális működésének fontosságára is felhívják a figyelmet. (Sison és mtsai 2010)

1.4.5 Glomeruláris sejtek szerepe a tubulointersticiális fibrózisban

Az ECM termelésért felelős sejtek kialakulásához az EMT, EndMT és egyéb transzdifferentiálódással járó folyamatok mellett a progenitor őssejtek folyamatos jelenléte és differentiálódása is hozzájárul. A korábban már említett peritubuláris kapillárisok pericitái, valamint a glomerulusok mezangiális sejtjei is kialakulásuk kezdeti szakaszán hasonló molekuláris mintázatot mutatnak, mindkettő sejtcsoport a FOXD1 fehérjét expresszáló embrionális progenitor sejtől származik. A glomeruláris bazális membrán struktúrájának megőrzéséért felelős másik epithél jellegű sejtípus a podocita, amely a pericitákhoz hasonlóan bazális membrán fehérjét termel, stabilizálja a glomeruláris endotél sejteket, a fenesztrációk fenntartásában részt vesz, és a kapilláris permeabilitást is befolyásolja. Glomeruláris károsodás hatására a pericitákhoz hasonlóan a podociták is mezangiális jellegű fehérjét kezdenek el

termelni, és ezáltal a pericitákhoz hasonló fenotípusúvá válnak. (Nakagawa és Duffield 2013)

1.5 Enzimatiszus elemek a tubulointersticiális fibrózisban

Az ECM mennyiségének növekedéséért az előzőekben leírt, sejtek illetve hormonok által indukált ECM termelő folyamatok mellett az ECM lebontásért felelős enzimek aktivitásának csökkenése is jelentős szerepet játszik. Fiziológias vesében a kollagén termelődés és lebomlás dinamikus egyensúlya figyelhető meg. Egér kísérleti modellben kimutatható volt, hogy a kollagén mintegy 20%-a 2 hetente újratermelődik. (Eddy 2014) Korábbi vizsgálatok során az ECM degradációért elsősorban a neutrális proteináz családba tartozó mátrix metalloproteinázokat (MMP) tartották felelősnek. Az MMP-nak eddig 23 típusát írtak le az emberi szövetekben, amelyek közül a vesében legalább 10 típus (1, 2, 3, 9, 13, 14, 24, 25, 27, 28) volt kimutatható. (Hijova 2005, Genovese és mtsai 2014) Utóbbi időben számos kísérleti adat utalt arra, hogy egyes MMP-ok (például az MMP2 és MMP9) a vesében az EMT, EndMT, fibroblaszt aktiváció, neutrofil granulocita stimuláció valamint a pericita-myofibroblaszt transzdifferentiálódás folyamataiban is szerepet játszanak. Emellett a MMP-ok nagyszámú fehérje, hormon, hormon-receptor, citokin és kemokin mennyiségét befolyásolják. (Catania és mtsai 2007, Zhao és mtsai 2013, Genovese és mtsai 2014)

A MMP-ok mellett az ECM központi alkotóelemét jelentő kollagén enzimatiszus lebontására a szerin proteázok (plazmin, katepszin G), ADAM fehérjék (dizintegrin és metalloproteináz), ADAMTS család (dizintegrin és metalloproteináz thrombospondin motívummal) tagjai, valamint a lizoszómális enzimek közül a cisztein proteázok (katepszin B, H, L) és aszpartát proteázok is képesek, mivel valamennyi említett enzim kollagenáz aktivitással is rendelkezik. Az eddigi vizsgálatok alapján a MMP enzimek a termelődő kollagének lebontása által a hegesedés folyamatát is gátolhatják, ezáltal a kiterjedt hegszövet megjelenését is megelőzhetik. Ugyanakkor a MMP2, MMP7, MMP9 génkiütött egerekben a vesefibrózis mértéke kifejezettebbé vált, amely megfigyelés arra utal, hogy további ECM-ben tárolt, inaktív állapotú hormon és sejtciklusszabályozó tényező is fontos lehet a fibrózis folyamatában. (Eddy 2014)

A MMP-ok mennyiségének egyik fő szabályozó mechanizmusa az MMP fehérjék enzimatiszus lebontása vagy az MMP enzimaktivitás gátlása a TIMP (tissue inhibitors of

metalloproteinase) fehérjék jelenléte által. Az emlős TIMP-ek közül eddig az 1, 2 és 3-as típust találták meg vesében. (Genovese és mtsai 2014)

A kollagenáz aktivitással rendelkező ADAMTS1 a sérült pericitában az egyik legnagyobb mértékben aktiválódásra képes géntermék. Az ADAMTS1 fehérje egyik természetes inhibitora a TIMP-3, amely nagy mennyiségben termelődik normális vesében. Szövetsérülés következtében a TIMP-3 mennyisége jelentős mértékben csökken. (Schrimpf és mtsai 2012)

Az ECM homeosztázis fenntartásában a MMP-ok aktivitásának modulálása mellett a proteáz inhibitorok hatása is számottevőnek tekinthető. A kötőszövet-újrateermeléshez hozzájáruló proteáz inhibitorok közül munkacsoportunkkal kísérleteink során a Plazminogén Aktivátor Inhibitor-1 (PAI-1) szerepét vizsgáltuk, így ennek in vitro és in vivo körülmények között kifejtett hatásait foglalom össze.

A Plazminogén Aktivátor Inhibitor-1 (PAI-1) a szerin proteáz enzim (szerpin) szupercsaládba tartozik, 50 kDa molekulatömegű fehérje, amely akut fázis fehérjeként a májban valamint zsírsejtekben termelődik, de emellett leírták vaszkuláris endotélsejtekben, szívizomsejtekben, fibroblasztokban és makrofágokban is a termelődését. A PAI-1 a vérplazmában keringve percekben mérhető féleletidejű, vitronektinnel alkotott komplexet alkotva azonban hosszú ideig stabil állapotú. A PAI-1 fehérje a normál vesében nem mutatható ki, azonban számos vizsgálat alapján a vese sejtes elemeiben (glomeruláris sejtek, tubuláris epitélisejtek, makrofágok, fibroblasztok) a PAI-1 fehérje expressziója indukálható. (Eddy 2002, Eddy és Fogo 2006, Eddy 2009, Ghosh és Vaughan 2012)

A PAI-1 fehérje vesefibrózisban betöltött szerepét többek között a fehérje mennyiségének változásával előidézett folyamatokban vizsgálták. Kísérletes állatmodellben PAI-1 termelés fokozódása összefüggést mutatott a vesefibrózis gyorsabb progressziójával. Mindezekkel ellentétben a PAI-2, nexin-1, szerin proteázok (uPA, tPA, plazmin) jelenléte nem növelte a fibrózis mértékét. (Oda és mtsai 2001, Matsuo és mtsai 2005) A PAI-1 fehérje hiánya, mutáns PAI-1 overexpresszió, valamint PAI-1 ellenes antitest használata csökkentette a vesefibrózis mértékét. (Huang és mtsai 2003, Huang és mtsai 2008, Huang és mtsai 2009)

A plazmin/plazminogén aktivátor/PAI rendszer szerteágazó hatása tekintetében számos kapcsolódási pont ismert a TGF- β rendszerhez, a renin-angiotenzin rendszerhez,

valamint az EMT folyamatához. A plazmin kínai hörcsög ovárium (CHO) sejtekben aktív TGF- β felszabadulást idéz elő, valamint szerepet játszik az EMT-ben is. (Lyons és mtsai 1990, Zhang és mtsai 2007) A gátló hatású PAI-1 ugyancsak szerepet játszik az EMT-ben és az EndMT-ben is, valamint PAI-1 génkiütött egerekben is nagymértékű kötőszövetfeszaporodás volt látható, elsősorban a szívben. (Ghosh és Vaughan 2012, Ghosh és mtsai 2013)

Számos kísérletes eredmény alapján az AngII hatására a PAI-1 expresszió mértéke fokozódik vaszkuláris simaizomsejtekben, valamint patkány és humán mezangiális sejtekben. (Ridker és mtsai 1993, van Leeuwen és mtsai 1994, Wilson és mtsai 1997, Motojima és mtsai 2000) Ezzel ellentétesen marha endotélsejtben és humán tubuláris epitélsejtekben a PAI-1 expresszió fokozódását AngIV jelenlétében látták, de az AngII-nek nem volt fehérjeexpressziót fokozó hatása. (Kerins és mtsai 1995, Gesualdo és mtsai 1999) Az AngII termelésért felelős renin enzim előalakjának, a proreninnek is látták a mezangiális sejtekben és ér simaizom sejtekben hatását, mindkét sejttypusban az AngII növelte a PAI-1, TGF- β 1 és a fibronektin mRNS mennyiségét. (Zhang és mtsai 2008, Zhang és mtsai 2012)

1.6 TGF- β hatása a vese epitél sejtekre és az EMT-re

A TGF- β kettős-arcú hatása kiterjedt szakirodalommal rendelkezik. A TGF- β egyrészt szükséges a normális egyedfejlődéshez, az extracelluláris mátrix homeosztázisának fenntartásához, ugyanakkor a fehérje túltermelődése olyan káros hatásokat indít el, amelyek végső soron fibrózishoz vagy rosszindulatú daganat kialakulásához vezetnek. A TGF- β a fibrózis folyamata mellett a rosszindulatú daganatok keletkezésében is fontos szerepet játszik, ugyanakkor egyes daganatellenes folyamatban is leírták lényeges hatását. (Connolly és mtsai 2012, Meng és mtsai 2016)

Vesében a TGF- β mennyiségének növekedése különböző, progresszív vesefibrózissal járó glomeruláris betegségekben figyelhető meg. Ezen betegségek közül leggyakoribbak a diabéteszes nefropátia, a fokális szegmentális glomeruloszklerózis (FSGS), IgA-nefropátia, félholdas gyulladásal járó glomerulonefritisek, és a lupusz nefritisz. A TGF- β -nak a glomeruloszklerózis kialakulásában is kiemelkedő szerepe van. Mindezen betegségek az ECM mennyiségének növekedésével járnak, és ezen betegségek

folyamatában a glomerulusban és az intersticiumban is mindhárom TGF- β izoforma (1-3) mennyisége, valamint a TGF- β receptorok száma is megemelkedik. (Loeffler és Wolf 2014)

A TGF- β hatására a vese hámjellegű sejtjei közül a podocitákban lábnyúlványok közötti tér kiszélesedése, fibronectin és kollagén IV (α 3) mennyiségének növekedése, ECM homeosztázisban szerepet játszó enzimek (például MMP9) termelésének növekedése, és a nefrin fehérje termelésének csökkenése jellemző. A TGF- β hatására a podociták p38, Caspase3, és a Smad7 mediálta apoptózis következhet be. TGF- β hatására a podocitákban EMT-re jellemző fehérjék expressziója következik be. (Loeffler és Wolf 2014)

Tubuláris epitélisejtekben a TGF- β 1, az „Advanced-Glycation End” termékek (AGE) és AngII hatására intersticiális fibrózis, EMT, apoptózis, tubuláris atrófia következik be, és egyes kísérletekben sejtproliferáció is észlelhető volt. További kísérleti modellekben TGF- β ellenes antitestek használata során csökkent a tubuláris atrófia és a tubuláris apoptózis mértéke. Wu és munkatársainak adatai alapján az epitélisejteken kívül a tubulusok környezetében előforduló periciták is aktiválódnak. Ezen folyamat során a sérült epitélisejtek által szekretált növekedési faktorok hatására pericita-myofibroblaszt tranzíció is bekövetkezhet, és megfigyelhető volt az is, hogy ezek a hatások nem jártak együtt a periciták sejtproliferációjával. (Wu és mtsai 2013, Loeffler és Wolf 2014)

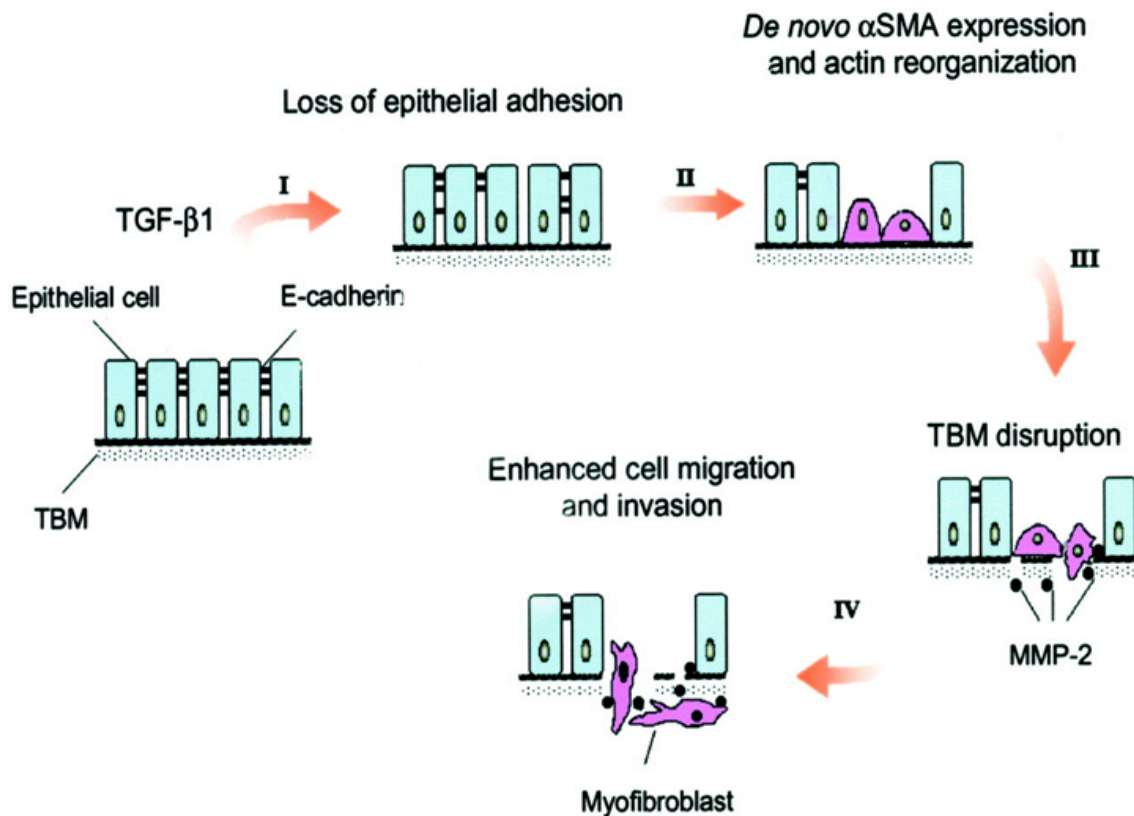
Összefoglalóan a tubulointersticiális fibrózis folyamata jellegzetes patofiziológiai lépésekből épül fel:

1. Aktivációs fázis: tubuláris, perivaszkuláris, mononukleáris sejtek aktivációja és intersticiumbeli megjelenésük, valamint ezen sejtekben gyulladásos fehérjék termelése és kibocsátása.
2. Fibrogenetikus szignál fázis: különböző sejtípusokban fibrózist elősegítő fehérjék (TGF- β , CTGF, AngII, PDGF) termelése.
3. Termelődési fázis: ECM alkotóelemeinek termelésének növekedése, ECM lebontás csökkentése.
4. Destrukciós fázis: az intakt működőképes nefronok számának csökkenése, és ezáltal a vesefunkció beszűkülése. (Loeffler és Wolf 2014)

In vitro kísérletek alapján TGF- β az EMT folyamatát indíthatja el, és a myofibroblasztok kialakulásához az alábbi lépések szükségesek:

1. Adhéziós molekulák (E-cadherin és ZO-1) expressziójának csökkenése, és az adhéziós molekulák lebontásáért felelős enzimek (MMP-ok) mennyiségének emelkedése.
2. α -SMA fehérje termelődés és az aktin reorganizáció a tubuláris epitelsejtekben.
3. A tubuláris bazális membrán lebontásáért felelős MMP-ok (MMP2, MMP9) mennyiségének megemelkedése.
4. A tubuláris epitelsejtek sejt-sejt kapcsolatainak megszűnése, és a sejtek intersticiumba vándorlása.

Az EMT kulcslépéseit Yang és munkatársa 2001-es publikációjukban a napjainkra már klasszikussá vált ábrájukban foglalták össze. (1. ábra)

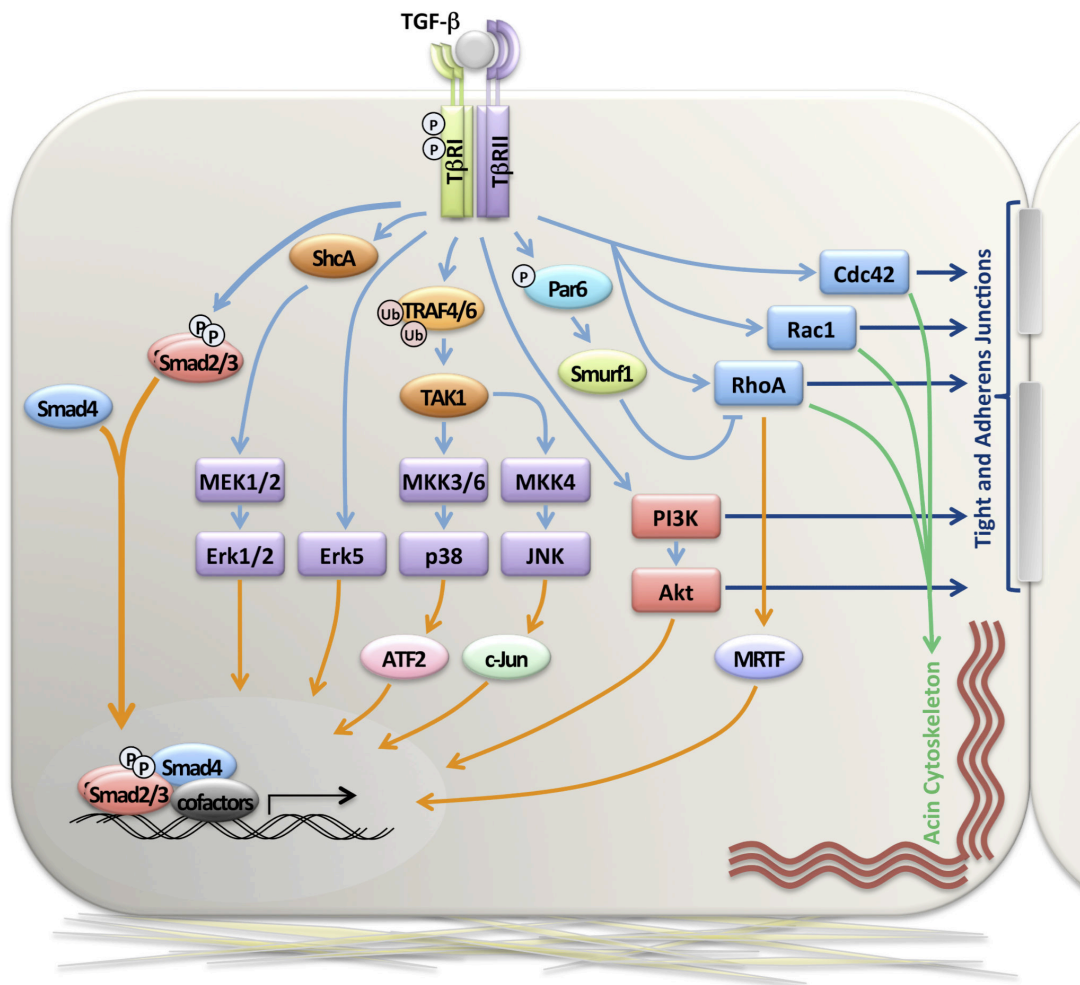


1. ábra: Az EMT folyamatának négy kulcslépése sematikusán. (Yang és Liu 2001)

1.7 Az α -SMA expresszió szabályozása az EMT során

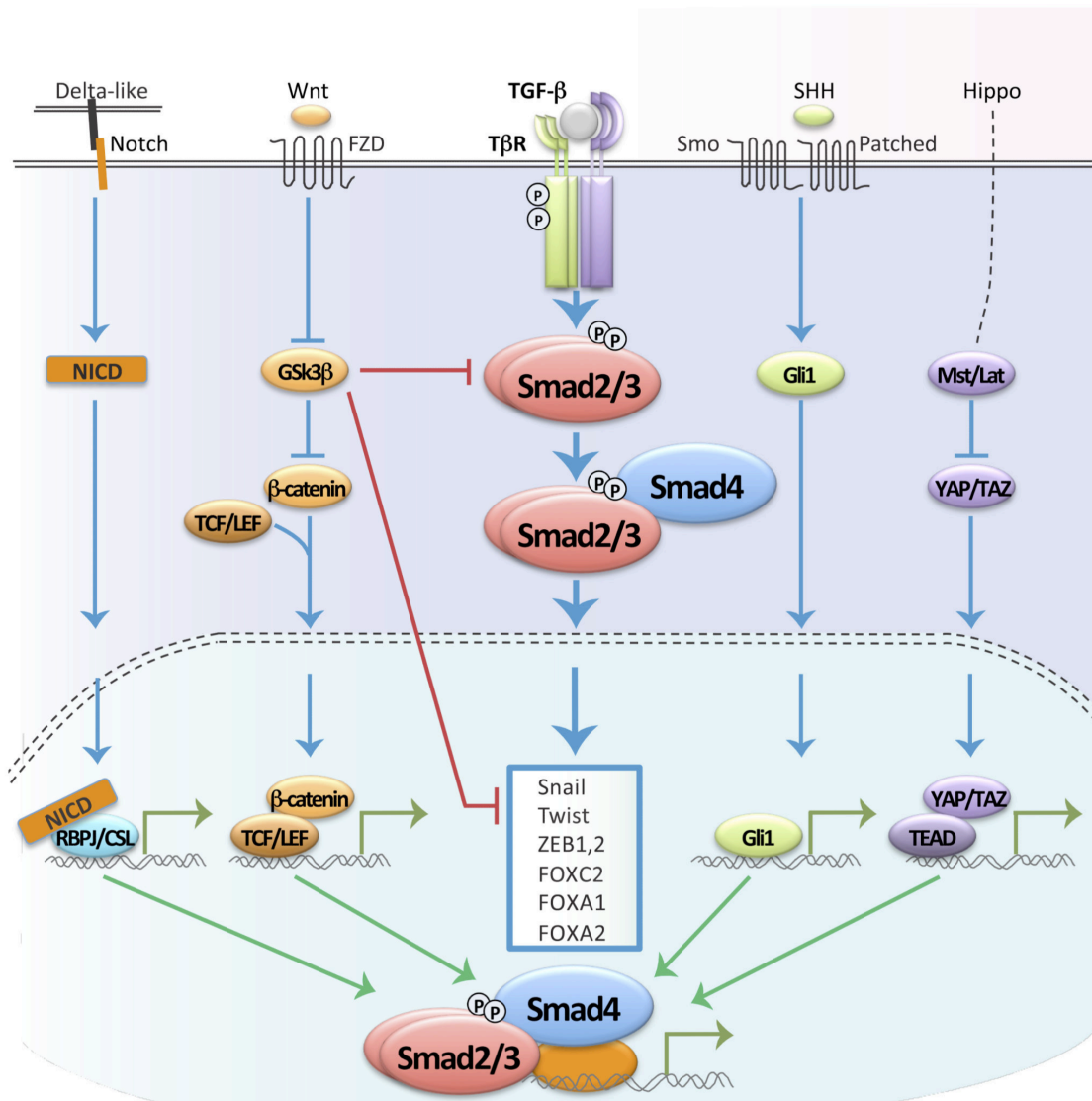
Az elmúlt évek irodalmi adatai alapján komplex kép rajzolódott ki az EMT-ben szerepet játszó szignál mechanizmusokról. A szignál mechanizmusok sejten belüli hálózatában

egymást erősítő és gátló folyamatok vannak, melyek közül a TGF- β 1 által szabályozott jellegzetes molekulákat a 2. ábrán foglalom össze.



2. ábra: TGF- β 1 által aktivált jelátviteli utak az EMT-ben. (Derynck és mtsai 2014)

A TGF- β 1 mellett számos egyéb Smad fehérjefunkciót és génexpressziót befolyásoló jelpálya is aktiválódhat EMT során, ezek összefoglalását a 3. ábra tartalmazza.



3. ábra: Jellegzetes jeltáviteli molekulák kapcsolata az EMT-hez vezető géntranszkripció szabályozásban. (Derynck és mtsai 2014)

A jelátviteli utak kölcsönös hatásának eredményeként jön létre az EMT markerekkel jellemezhető myofibroblaszt fenotípusú sejt. Az α -SMA fehérje a myofibroblasztok egyik jellegzetesen expresszált fehérjéje és ezáltal az EMT egyik jól használható markere. Az α -SMA hatására a myofibroblasztok kontraktilitása és mozgékonyága növekedik, és az α -SMA mennyisége akár a teljes sejt aktin tartalmának 14%-t is elérheti. (Arora és McCulloch 1994)

Az α -SMA termelődés szabályozásában nagyszámú extracelluláris hormon és fehérje vesz részt, amelyek közül számos fehérje az extracelluláris mátrix termelődését is

elősegíti, mint például a TGF- β , az AngII, a PDGF- β , és az Epidermális Növekedési Faktor (EGF).

Az α -SMA gén promóterében számos jól leírt szabályozó szakasz van, amelyek közül a legfontosabbak a TATA-box, CArG-domének, két E-box (CAnnTG). A CArG domének a Serum Response Factor-ra (SRF) érzékenyek. A TATA-box mellett további TGF- β 1 kontrol element (TCE) is leírásra került. (Hautmann és mtsai 1997) Emellett az α -SMA gén promóterben két Smad érzékeny promóterszakasz is van. (Hu és mtsai 2003)

Munkacsoportunk az α -SMA gén promóterének aktivitását szabályozó számos intracelluláris jelátviteli molekula azonosítását végezte el. LLC-PK₁ sejtekben a TGF- β 1 indukált α -SMA promóter aktiválásban a p38 β kináz, a p38 β kinázt aktiváló MKK3, a Smad3 fehérje szerepe igazolódott, míg a Smad7 fehérje jelenléte az α -SMA promóter aktivitásra gátló hatással volt. (Sebe és mtsai 2008)

Ugyanezen LLC-PK₁ sejtekben az EMT folyamatához vezető α -SMA promóter aktivitáshoz többek között a sejtkapcsoló-strukturák megbomlása által előidézett jelátviteli utak aktiválódása is szerepet játszik, így a vizsgálatok során kis G-fehérjék közül a Rac, PAK és p38 MAPK szerepe igazolódott. Ezen vizsgálatok során a Myocardin-related transcription factor (MRTF) (vagy Megaloblastic Leukemia protein-1 = MKL-1) fehérje szerepét is vizsgálta munkacsoportunk. (Sebe és mtsai 2008)

Az MRTF a kardiovaszkuláris rendszer, központi idegrendszer és harántcsíkt izomzat fejlődésének szabályozása mellett fibrózisban, valamint daganatok áttétképzésben is fontos szerepet játszik. Első alkalommal a MRTF-A-t a Serum Response Factor (SRF) kofaktoraként írták le szívizomsejtekben és simaizomsejtekben. Későbbiekben az MRTF-A számos más funkcióját is leírták, többek között a fehérvérsejtek kitapadásához, fibroblaszt-myofibroblaszt tranzícióhoz és megakariocita differenciációhoz is hozzájárul. (Li és mtsai 2005, Elberg és mtsai 2008, Medjkane és mtsai 2009, Mokalled és mtsai 2010, Scharenberg és mtsai 2010, Crider és mtsai 2011, Li és mtsai 2012, Xu és mtsai 2014)

A diabéteszes nefropátia molekuláris mechanizmusait vizsgálva újabb adatok arra utalnak, hogy a MRTF-A részt vesz a magas cukorkoncentráció által előidézett fibrózisban, ezen folyamatra a kollagén Ia fehérje mennyiségének növekedése jellemző. (Xu és mtsai 2014)

Az MRTF a SRF kofaktoraként olyan gének expresszióját befolyásolja, amelyek CA_{RG} box-ot tartalmaznak. Ilyen gén többek között az α -SMA is, ennek promóterében a korábbiakban leírtaknak megfelelően CA_{RG} box van. (Mack és Owens 1999, Mack és mtsai 2000, Wang és mtsai 2002, Fan és mtsai 2007, Elberg és mtsai 2008) Az MRTF az SRF-től függetlenül is képes mátrix fehérjék expresszióját szabályozni, erre példa a tenascin C expresszió szabályozása az MRTF által. (Asparuhova és mtsai 2011)

Az MRTF mRNS termelődésének növekedését és citoplazmából sejtmagba történő transzlokációját elősegíti a TGF- β 1, és ezen folyamat fontos elemei a RhoA, Rac1, Cdc42 kis GTPáz fehérjék. Az MRTF fehérje gátlásával a TGF- β 1 indukálta α -SMA expressziót gátolható. (Fan és mtsai 2007, Busche és mtsai 2008, Sebe és mtsai 2008, Sebe és mtsai 2010, O'Connor és Gomez 2013, Velasquez és mtsai 2013, Johnson és mtsai 2014, Scharenberg és mtsai 2014)

1.8 A Suppressor of Cancer Cell Invasion (SCAI) fehérje szerepe

A "Suppressor of Cancer Cell Invasion" (SCAI) fehérje Brandt és munkatársai által nemrégiben leírt fehérje, amelyet elsőként tumorsejtek inváziós aktivitásának gátlásával kapcsolatban írtak le. (Brandt és mtsai 2009)

További vizsgálatok során a SCAI fehérje mennyiségének csökkenése volt megfigyelhető négy különböző tumorsejtvonalon és hét különböző humán szolid tumorban is, mint például emlő invazív karcinóma, vagy tüdő laphámkarcinóma. Emellett a malignus tumorok inváziós készségének egyik jól használható markerének, a β 1-integrin fehérje termelődésének szabályozását is befolyásolja a SCAI fehérje. A β 1-integrin promóterének aktiválásához ugyancsak SRF/MRTF-A fehérjekomplex kapcsolódása szükséges, és ezen aktív fehérjecsomag kialakulását is in vitro elősegítette a SCAI fehérje. Tekintettel arra, hogy a β 1-integrin mennyiségének növekedése hozzájárul a malignus tumorsejtek inváziós készségének növekedéséhez, így felvethető volt a SCAI fehérje fontos szerepe a malignus tumorok inváziójának illetve daganat áttét kialakulásának folyamatában. (Brandt és mtsai 2009)

Brandt további vizsgálatai során az MRTF családba tartozó fehérjék (Myocardin, MRTF-A és MRTF-B) szerepével foglalkozott. Ennek során egyes tumorsejtekben a MRTF-A és MRTF-B megnövekedett expresszióját kifejezettebb invazivitással és nagyobb számú daganat áttét kialakulásával hozta összefüggésbe. Ezzel ellentétesen a

myocardin túltermelése következtében a szarkóma eredetű tumorsejtek növekedésének gátlása volt igazolható. (Brandt és mtsai 2009)

2 Célkitűzések

A vesefibrózis kialakulását és az EMT folyamatát szabályozó tényezők ismerete, valamint a SCAI fehérje MRTF transzkripciós kofaktor aktivitását befolyásoló hatásának újabb adatai vezettek azon kérdéshez, hogy a SCAI fehérje milyen módon szabályozza az α -SMA expressziót és az EMT folyamatát. Emellett a vesefibrózis progressziójához és az ECM homeosztázis károsodásához vezető folyamatok közül a PAI-1 fehérje szerepének vizsgálatát tűztük ki célul. Vizsgálni kívántuk azt is, hogy a SCAI fehérje in vitro körülmények között már részben leírt tumorigenezisben betöltött szerepe megerősíthető-e további kísérletes körülmények között, elsősorban humán szövetminták vizsgálatával.

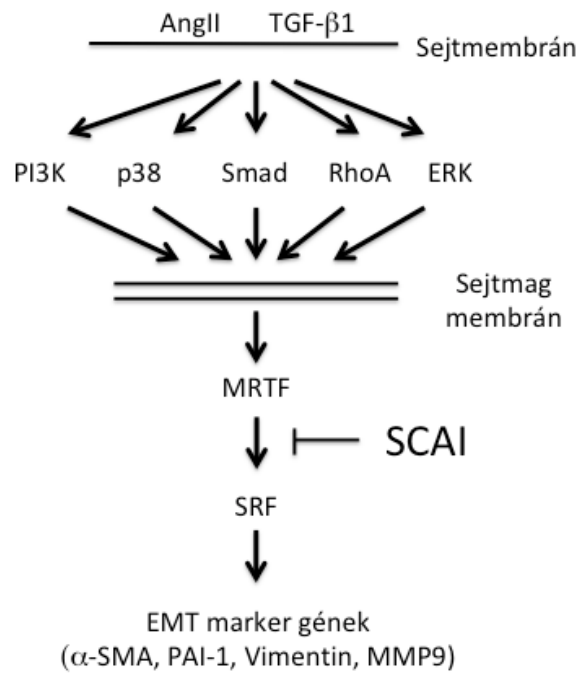
Munkám során a következő hipotéziseket állítottam fel:

1. A vesefibrózis folyamatában különböző gének (SCAI, PAI) expressziójának változása figyelhető meg, és ezek által termelt fehérjék kimutathatóak állati és humán sejtekben, szövetekben.
2. Az α -SMA és a PAI-1, mint az EMT és a vesefibrózis markerei, számos jelátviteli mechanizmus által szabályozottak, munkám során újabb jelátviteli mechanizmusok részleteit kívántam vizsgálni.
3. A vesefibrózis folyamatában leírt SCAI-hoz kapcsolódó folyamatok humán vesedaganatokban is szerepet játszhatnak, és vizsgálni kívántam, hogy a SCAI expresszió csökkenése mennyire általános különböző tumorokban.

A hipotézisek alapján az alábbi kérdéseket fogalmaztam meg:

1. Milyen hatással van az EMT-re a SCAI fehérje különböző állati és humán sejttypusokban és szövetekben?
2. Kimutatható-e a SCAI fehérje humán rosszindulatú daganatos szövetekben, és milyen szerepet játszik a daganatok kialakulásában?
3. Milyen hatással van a renin-angiotenzin rendszerhez tartozó AngII az ECM homeosztázisban szerepet játszó PAI-1 mennyiségnek szabályozására?

A megválaszolendő kérdésekben szereplő molekulák közötti kapcsolatokat a 4. ábrán összegeztem.



4. ábra: A célkitűzésben vizsgálni kívánt intracelluláris szignál-kapcsolatok egyszerűsített bemutatása. A SCAI hatása az EMT szempontjából releváns intracelluláris jelátviteli utakra.

3 Módszerek

3.1 Anyagok és eszközök

A felhasznált anyagok és gyártóik listáját az 1. táblázat tartalmazza. A kísérletek során használt vegyszerek (ahol külön nincs jelölve) a Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) gyár termékei voltak.

1. táblázat

Felhasznált anyagok és gyártóik listája

Anyag	Gyártó
DMEM	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
FBS	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Penicillin-streptomycin	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
TGF- β 1	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Geneticin	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Angiotensin II	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Genistein	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Bisindolylmaleimid	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
SB203580	Calbiochem (San Diego, CA, USA)
PD98059	Calbiochem (San Diego, CA, USA)
Angiotensin IV	Peninsula Laboratories (Belmont, CA, USA)
Candesartan	Astra Zeneca (Mölnal, Svédország)
Luciferin	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)

3.2 Sejtkultúra

A C14 klónszámú, nyúl angiotenzin II 1-es típusú receptorát stabilan expresszáló sertés proximális tubuláris epitél sejtek (LLC-PK₁/AT₁) Dr. R. Harris ajándéka volt. (Burns és Harris 1995) A mIMCD-3 vese medulláris gyűjtőcsatorna sejtek at ATCC-től

származnak (ATCC, Manassas, VA, USA). Az LLC-PK₁/AT₁ és az mIMCD-3 sejteket Dulbecco által módosított Eagle-médiumban (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) növesztettük, amely a glükózt magas (4500 mg/L) koncentrációban tartalmazta, valamint 10%-os borjúmagzat szérumot (Fetal Bovine Serum, FBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 100 IU/mL penicillin és 100 µG/mL streptomycint, valamint egyes kísérletekben 600 µG/mL geneticint tartalmazott. A sejt-inkubátor hőmérséklete 37 °C volt, a párasított levegő 5% CO₂-t tartalmazott. A sejteket egyes kísérletekben 60 mm átmérőjű csészére osztottuk, majd 50 %-os konfluenciáig növesztettük. Más kísérletekben a sejteket 6 és 24 csészét tartalmazó tálcákon növesztettük. A hosszantartó Ca²⁺-megvonás első lépéseként a sejteket izotóniás, pufferolt foszfát oldatban (PBS = phosphate buffered saline, 140 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 5 mM glükóz, 20 mM HEPES, pH 7,4) háromszor mostuk, majd CaCl₂ mentes DMEM-ben inkubáltuk. A kontrollként használt sejteket szérum-mentes kalciumot tartalmazó DMEM-ben inkubáltuk. A sejteken használt TGF-β1 koncentrációja 10 nG/mL volt, a kezelések módját az egyes kísérleteknél külön jeleztem.

3.3 TGF-β1 transzgenikus egértörzs

CBA.B6-Alb/TGF-β1(cys223,225ser) transzgenikus egértörzs Dr. S.S. Thorgeirsson ajándéka volt. (Sanderson és mtsai 1995) Az egerek csíramentes környezetben nevelkedtek a Semmelweis Egyetem NET GMO részlegében, 10 óra / 14 óra világos és sötét ciklusban. Az egerek rágcsáló tápanyagot kaptak, és ivóvízhez szabad hozzáféréssel rendelkeztek. Valamennyi állatkísérlethez a Semmelweis Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottság adott engedélyt (XIV-I-001/2146-4/2012), és az állatokkal kapcsolatos tevékenységek összhangban voltak a National Institute of Health (NIH, USA) laboratóriumi állatokra vonatkozó ajánlásaival és előírataival.

3.4 Plazmidok

3.4.1 Promótert és riporter gént tartalmazó konstruktok

Kísérleti rendszerünkben szentjánosbogár luciferáz enzim elé klónozott promóter régiókat tartalmazó plazmid-konstruktokat használtunk. A promóter működésére a termelődött luciferáz enzim aktivitásának mérésével követtettünk.

A 765-bázispár (bp) hosszú patkány α -SMA promóterrészt tartalmazó PA₃-Luc vektor (pSMA-Luc) Dr. Raphael Nemenoff (University of Colorado, Denver, CO, USA) ajándéka: a patkány α -SMA promóterének proximális 765 bázispár (bp) (-713/+52) hosszú szakaszát tartalmazza, PA₃-Luc szentjánosbogár luciferáz enzimet kódoló plazmidba klónozva. (Garat és mtsai 2000)

A PAI-1 promóter aktivitásának méréséhez -740 és +44 bázispár közötti szakaszát tartalmazó promóter szakaszt használtunk, amely pA₃LUC vektorba klónoztak. (Mucsi és mtsai 1996)

A belső kontrollként használt timidin-kináz vezérelt Renilla luciferáz vektor (pRL-TK) a Promega (Madison, WI, USA) terméke volt.

3.4.2 Expressziós vektorok

Zöld fluorescens fehérjével (GFP) jelölt vad típusú (606 bp hosszú génszakaszt tartalmazó teljes SCAI-t kódoló, GFP-SCAI jelzésű) és az N-terminális végen megrövidített (+212 és +606 bp közötti szakaszt tartalmazó, GFP-SCAI Δ nt jelzésű) SCAI vektorok Dr. Robert Grosse (University of Heidelberg, Heidelberg, Németország) ajándékai. (Brandt és mtsai 2009)

Cl100 (vagy másnéven egér MAP kináz foszfatáz 1 (MKP-1)) egy cytomegalovirus promótert tartalmazó vektorba (pcDNA3.1) (Invitrogen, San Diego, CA, USA) volt klónozva. (Mucsi és mtsai 1996)

Konstitutívan gátolt c-Jun N-terminális Kináz (T183A és Y185F aminosavcserék, DN-JNK) plazmidja Dr. P. Andreka és Dr. N. H. Bishopric (University of Miami, Miami, Florida, USA) ajándéka volt. (Johnson és mtsai 1996, Andreka és mtsai 2001)

A gátló hatású Smad7 fehérjét kódoló vektor Dr. E. Bottinger (Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York, USA) ajándéka volt. (von Gersdorff és mtsai 2000, Schiffer és mtsai 2002)

3.5 Tranziens transzfekció és luciferáz promóter aktivitás mérés

Az α -SMA promóter aktivitás mérésével járó kísérletekben 6 csészés lemezen növesztett sejt kultúrát majdnem teljes, vagy teljes konfluenciánál FuGene 6 (Roche, Mannheim, Németország) reagenssel transzfektáltuk, amelynek során 1 μ g plazmid DNS-hez 2,5 μ L FuGene 6-t használtunk. A promóter aktivitás méréséhez 0,5 μ g pSMA-Luc (vagy pGL₃-SMA-Luc) luciferáz reporter plazmid és 0,05 μ g pRT-TK kotranszfekcióját végeztük, amely mellett 2 μ g üres vektort (pcDNA3.1, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), vagy specifikus vektor-konstruktot (konstitutívan aktív, vagy domináns negatív, vagy vad-típusú) adtunk. A transzfekció előkészületeként az előzetesen kiszámolt szükséges FuGene 6-t antibiotikum és szérum mentes optiMEM médiummal kevertük, majd 5 percig pihentettük. Ezt követően az oldathoz hozzáadtuk az előzetesen összeállított plazmid-koktélt, összekevertük, majd további 15 percet vártunk. Az így összeállított oldatból a sejtek tápoldatához minden csésze esetén 100 μ L-t adtuk, majd 16 órát inkubáltuk. Ezt követően a sejteket 3x PBS-sel mostuk, és további 4 órát szérum mentes DMEM-el inkubáltuk. Kezelésként a tápoldathoz TGF- β 1-t vagy annak vivőanyagát adtuk amellyel további 16 órát inkubáltuk a sejteket. Kalcium megvonásos kísérlet esetén a sejteket ismért PBS-sel mostuk, és további 24 órát inkubáltuk káliumot tartalmazó, vagy kalcium-mentes DMEM-mel. Végül a sejteket jéghideg PBS-sel mostuk, és 500 μ L Passive Lysis Buffer-ba (Promega, Madison, WI, USA) lekapartuk. Fagyasztás (-80 °C) – olvasztás (+37 °C) módszerrel a sejteket feltártuk, és a centrifugálással tisztítottuk (12000 rpm, 5 perc, 4 °C). A szentjánosbogár és Renilla luciferáz aktivitás mérést a gyártó leírásának megfelelően végeztük vagy egy Berthold Lumat LB 9507 luminométerrel, amelynek során 100 μ L pufferhez 20 μ L mintát adtuk, vagy a Dual-Luciferase Reporter Assay Kittel (Promega, Madison, WI, USA) egy Viktor X3 2030 Multilabel Plate Reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) eszközön. A szentjánosbogár luciferáz enzimaktivitást a belső kontrollként használt, ugyanazon mintában mért Renilla luciferáz aktivitással

normalizáltuk, a két enzimaktivitás hányadosát képezve. Minden mérésünket párosával végeztük, a kísérleteket három alkalommal ismételtük. Immunfluoreszens analízishez csészénként 1-2 µg plazmidot transzfektáltunk.

A PAI-1 promóter aktivitás méréssel járó kísérletekben az 50%-os konfluenciát elérő, 60 mm-es csészén növesztett LLC-PK₁/AT₁ sejteket kalcium-foszfát precipitációs módszerrel transzfektáltuk, amelynek során összesen 12,5 µg plazmidot használtunk: 2,5 µg riporter konstruktot (PAI-Luc), 7,5 µg gátló plazmidot vagy üres pcDNA3.1-t, és további 2,5 µg üres pcDNA3.1 vektort. 16 órával később a sejteket háromszor PBS-sel mostuk, majd szérummentes DMEM-mel tovább inkubáltuk. További 6 órát követően a sejteket az adott kísérletnél jelzett koncentrációjú AngII-vel, AngIV-gyel vagy TGF-β1-gyel 21 órán át kezeltük. Egyes kísérleteknél specifikus gátlószereket alkalmaztunk, amelyeket a kezelést megelőzően 45 perccel juttattunk a tápoldatba. A kezelés végeztével jéghideg PBS oldattal a sejteket mostuk, majd 250 µL-nyi 100 mM KH₂PO₄ és 1mM DTT tartalmú oldatban a sejteket lekapartuk. A sejtlizátumot fagyasztás-olvasztásos módszerrel előkészítettük, majd a sejtes elemeket a 14000 rpm, 5 perc, 4 °C-on centrifugáltuk, és szeparáltuk. A felülúszóból a luciferáz aktivitást luminometriás módszerrel mértük. (Goldberg és mtsai 1992, Chang és Goldberg 1995, Huszár és mtsai 2001)

3.6 A kísérletek során használt antitestek

Kísérleteink során az α-SMA (egérben termelt, 1:100 hígítás) (Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) és SCAI (patkányban termelt, 1: 100 hígítás) (Dr Robert Grosse ajándéka, (Brandt és mtsai 2009)) elsődleges antitesteket használtunk.

Kísérleteink során Alexa 594 konjugált anti-egér (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) és Alexa 568 konjugált anti-patkány (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) másodlagos antitesteket használtunk.

3.7 Immunfluoreszens mikroszkópia

A sejteket steril 8 rekeszes Nuc Lab-Tek II Chambered Coverglass (Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA) tárgylemezen növesztettük, majd 4 %

paraformaldehidet tartalmazó Dulbecco modifikált PBS-ben (DPBS) 30 percig szobahőn fixáltuk. Ezt követően DPBS-ben a sejteket mostuk, és 60 percet blokkoltuk 2 mg/mL marha szérum albumint, 1% hal zselatint, 5% kecske szérumot, 0,1 % Triton X-et tartalmazó DPBS-ben. Mosást követően a sejteket további 60 percet inkubáltuk az elsődleges antitesttel. Alapos mosást követően további 60 percet inkubáltuk a fluorescensen jelölt másodlagos antitesttel. A sejtmagokat DAPI-val (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) jelenítettük meg. A sejteket tartalmazó lemezeket üveg tárgylemezre helyeztük, közöttük Fluorescence Mounting Medium (Dako, Glostrup, Dánia) volt. A sejteket Olympus FV500-IX konfokális lézer scanning mikroszkóppal (Olympus Optical Co. Europe, Hamburg, Németország) vizsgáltuk.

3.8 Humán szövetminták immunhisztokémiai vizsgálata

A SCAI fehérje expressziós mintázatának vizsgálatához formalin fixált, paraffinban ágyazott szövetmintákat használtunk, amelyeket a Semmeweis Egyetem 2. számú Patológiai Intézet szövettani archivumból válogattunk. Munkánkhoz a Semmelweis Egyetem Etikai Bizottságától TUKEB 5/2011. számon és IKEB 2017/2011 számon kaptunk etikai engedélyt.

A páciensek szövetmintáit a betegségek diagnózisa és további jelölt kritériumok alapján választottuk, valamennyi esetben diagnosztikus célból kerültek a páciensből eltávolításra. A vesebiopsziás szövetmintákhoz tartozó diagnózis adatait, valamint a klinikai kórtörténet releváns adatait a képaláírások illetve mellékelt táblázat tartalmazzák.

A szövetmintákat a szövettani feldolgozás kezdetén 4%-os semleges pufferolt formalinban (4% formalin, 4 g/L monobázisos nátrium foszfát monohidrát, 6,5 g/L dibázisos nátrium foszfát anhidrát, pH 7,2-7,4) 24 órát fixálódta. A szövetminták paraffinba ágyazását követően 3-4 μ M vastag szeletek készültek. Az antigén feltárását 0,1 mol/L Na-citrát pufferban (pH 6,0) végeztük. Először Samsung M182DN típusú mikrohullámú melegítővel 850 W-os teljesítménnyel forralást végeztünk, majd 600 W-os teljesítménnyel 20 perces melegítést végeztük. A blokkolást a gyártó előírásának megfelelően 1 cseppnyi oldattal 30 percig végeztük (Powerblock, Biogenex, Fremont, Ca, USA), majd az elsődleges antitestként a SCAI antitestet használtuk, ezt követően Supersensitive Rabbit link-et (BG-HK336-9R, Supersensitive Link, Biogenex, Fremont,

Ca, USA) és alkalikus foszfatáz konjugált streptavidint (BG-HL331-5K, Supersensitive Link, Biogenex, Fremont, Ca, USA) alkalmaztunk. Az előhívást Dako Liquid Permanent Red (K064011, Dako, Glostrup, Dánia) alkalmazásával végeztük. A sejtmagokat Mayer hematoxilin oldattal (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) festettük.

A veséből származó szövettani metszeteket Leica DMR HC (Leica Microsystems, Wetzlar, Németország) fénymikroszkóppal vizsgáltuk.

A vastagbélből származó szövettani metszeteket Pannoramic P250 metszet szkennelvel 40x objektívvel és Hitachi kamerával beszkeneltük (3DHitech Kft, Budapest, Magyarország), majd a Pannoramic Viewer programban a tumormentes nyálkahártya és a tumor területének kézi kijelölését követően a NuclearQuant modullal értékeltük a sejtmagbeli jelintenzitást. Módosított Histo-score (H-score, Hirsch-score) értéket számoltunk 4 osztatú skálán (0: nincs jel, 1: gyenge jel, 2: közepes jel, 3: erős jel), így az H-score értékek 0 és 300 közöttiek lehettek. (Hirsch és mtsai 2003)

3.9 Kvantitatív RT-PCR mérés

Kvatitatív RT-PCR (RT-qPCR) mérés során mIMCD-3 sejteket 6-csészes edényben növesztettük, majd a sejteken az adott kísérletben jelzett kezelést alkalmaztunk. A kezelést követően a sejteket PBS-sel mostuk, ezt követően teljes RNS-t izoláltunk TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) oldattal a gyártó előiratának megfelelően.

A TGF- β 1 transzgenikus egerből származó veséből 100 mg homogenizált vese szövetállományt használtunk, majd teljes RNS-t izolálunk SV Total RNA Kit használatával (Promega, Madison, WI, USA).

Ezt követően mindkét kísérletsorozatban összesen 2 μ g RNS-t reverz transzkripció útján cDNS-sé írtunk át High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit-tel (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), random primerek használatával. A PCR reakciót BioRad CFX thermal cycler (BioRad, Herkules, CA, USA) eszközön végeztük Maxima SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Scientific, USA) használatával. A PCR reakció során a hőmérsékletbeállítás a következő volt: 95 °C 15 másodpercig, 60 °C 60 másodpercig, összesen 40 cikluson keresztül. A PCR reakció specificitását és hatékonyságát az olvadási görbe és a standard görbe analízisével ellenőriztük. A

mintákat kettésével vizsgáltuk, és GAPDH-hoz normalizáltuk. Az átlagos értéket a következő formulával fejeztük ki: $2^{-\Delta\Delta C_t}$. A primerek bázissorrendje a következő volt:

SCAI:

5' -ACCCCTGTTCATCGTTGTG-3' (forward)

5' -CGAGTGGCTGTCCAAACAA-3' (reverse)

GAPDH:

5' -CTTTGTCAA-GCTCATTTCTGG-3' (forward)

5' -TCTTGCTCA-GTGTCTTGC-3' (reverse).

Kísérletenként 3 párhuzamos mérést végeztünk, és a méréseket további két alkalommal megismételtük. Az eredmények átlagát és standard deviációját (SD) ábrázoltuk.

3.10 Gén microarray adatelemzés

A gén expressziós adatsorokat a National Cancer for Biotechnology Information (NCBI) Gene Expression Omnibus (GEO) adatbázisából töltöttük le. A SCAI gén expresszióját 3 különböző adatsoron vizsgáltuk:

GDS3853 adatsor: emlő rosszindulatú daganat (tumormentes emlő szövet, in situ emlőrák /duktális típusú/, invazív emlőrák /duktális típusú/)

GSE21815 adatsor: vastagbél rosszindulatú daganat (tumormentes vastagbél szövet, vastagbélrák /1-4 stádium között/)

GDS4393 adatsor: áttétet adó vastagbél rosszindulatú daganat (primer daganat, daganat áttét).

Az adatsorok mintacsoportjainak SCAI mRNS normalizált expressziós értékeit hasonlítottuk össze egymással.

3.11 Statisztikai elemzés

Valamennyi transzfekciót duplikátumban végeztük, és legalább 3 alkalommal megismételtük. Az eredmények ábrázolásakor az átlagot és standard deviációt jelöltük, és a luciferáz aktivitást a kezelt és kezeletlen csoportok között hasonlítottuk (relatív promóter aktivitás) össze. Ezen kísérletekben a statisztikai elemzések során Student t-próbát és 1-utas ANOVA-t használtunk.

Az emlő és vastagbél expressziós adatbázisok adatainak elemzésekor Kruskal-Wallis és Dunn's multiple comparison tesztet használtunk.

A TGF- β 1 transzgenikus egérmodellnél Mann-Whitney U-tesztet használtunk.

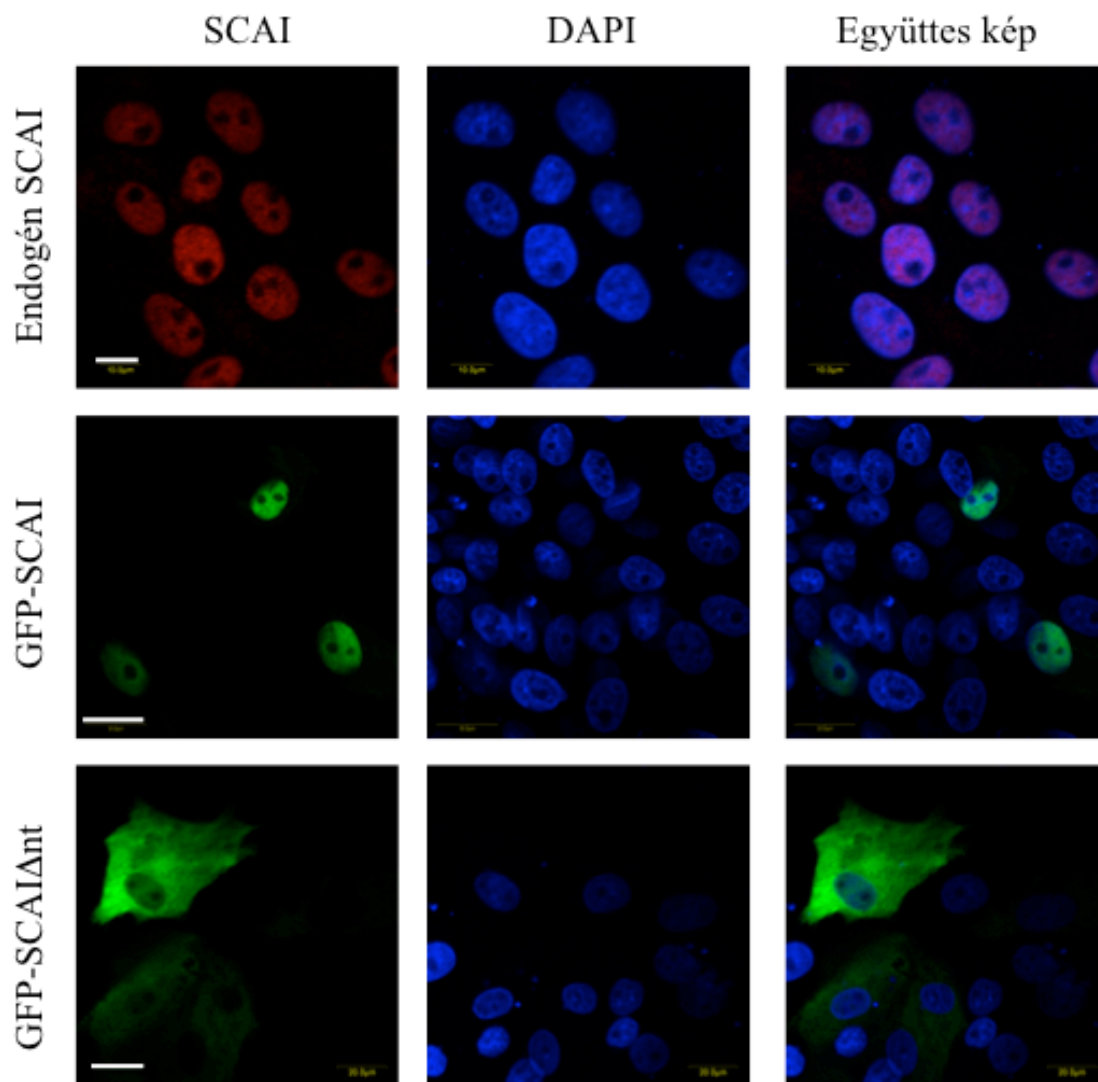
Immunhisztokémiai és immunfluoreszens vizsgálatok esetén reprezentatív képet mutatunk be.

4 Eredmények

4.1 A SCAI fehérje hatása az EMT folyamatában állati és humán sejttípusokban és szövetekben

4.1.1 A SCAI fehérje kifejeződése az LLC-PK₁/AT₁ sejtekben

A SCAI fehérje vesében történő kifejeződésének korábbi vizsgálatainak során bemutatásra került a SCAI mRNS expressziója a vesében, ugyanakkor egyes sejttípusokra jellemző SCAI fehérje expresszióra, illetve a fehérje expresszió lokalizációjára vonatkozóan eddig nem volt elérhető információ. Mindezek miatt a proximális tubuláris epitélsejtvonalon vizsgáltuk a SCAI fehérje kifejeződési mintázatát, és a SCAI fehérje subcelluláris lokalizációját demonstráltuk az LLC-PK₁/AT₁ sejtekben. Az LLC-PK₁/AT₁ sejtek által termelt endogén SCAI, valamint a GFP-hez kötött SCAI is a sejtmagban volt elsősorban megfigyelhető, a citoplazmatikus kifejeződés nem volt számottevő. Az N-terminális végen megrövidített (GFP-SCAI Δ nt jelzésű) SCAI ugyanakkor döntő részben az LLC-PK₁/AT₁ sejtek citoplazmájában volt megfigyelhető, a sejtmagi kifejeződés nem volt számottevő. (5. ábra)

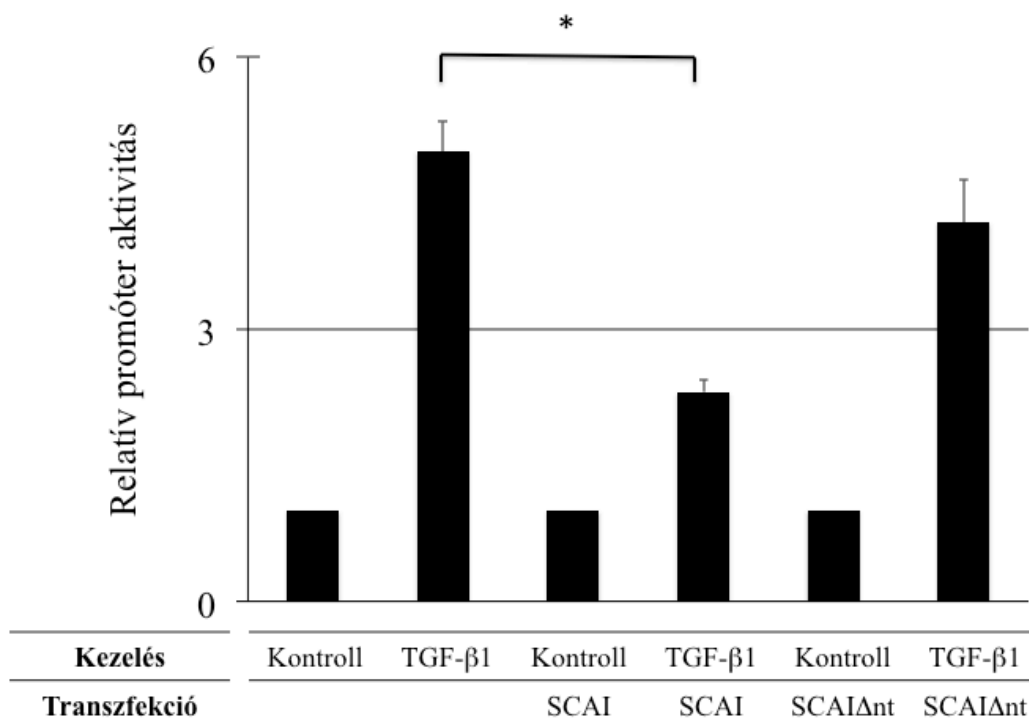


5. ábra: SCAI fehérje kimutatása LLC-PK₁/AT₁ sejtekben. Az endogén SCAI fehérje (piros szín) a sejtmagban helyezkedik el. A GFP-SCAI-val transzfektált sejtekben a SCAI fehérje (zöld szín) ugyancsak a sejtmagban helyezkedik el. GFP-SCAI Δ nt-nel transzfektált sejtekben a SCAI fehérje (zöld szín) elsősorban citoplazmában látható. Konfokális fluorescens mikroszkópia, a képek bal alsó sarkában látható vonal a felső sorban 10 μ m, a középső és alsó sorban 20 μ m hosszú.

4.1.2 A SCAI fehérje gátolja a TGF- β 1 által indukált α -SMA promóter aktivitás fokozódást

Következő kísérletünk a SCAI fehérje overexpresszió szerepét vizsgálta a TGF- β 1 által előidézett α -SMA promóter aktivitás változásban, és vizsgáltuk a TGF- β 1 hatását az α -SMA fehérje expresszióra vonatkozóan is.

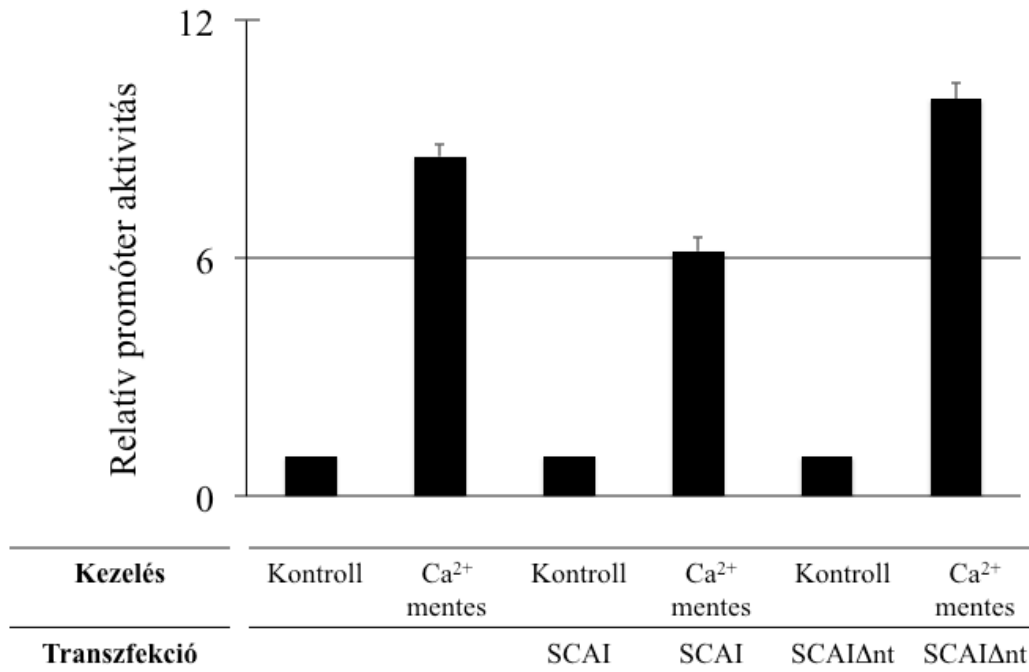
Első lépésben LLC-PK₁/AT₁ sejtekben SMA-Luc plazmiddal tranziens transzekciót és luciferáz enzim aktivitás mérést végeztünk, és vizsgáltuk a TGF- β 1 által indukált α -SMA promóter aktivitás változást. Mint ahogyan korábban megfigyelhető volt, a TGF- β 1 mintegy négyszeres α -SMA promóter aktivitás emelkedést idéz elő nem konfluens LLC-PK₁/AT₁ sejtekben. (Masszi és mtsai 2003) Mostani kísérletünkben hasonló, mintegy ötszörös α -SMA promóter aktivitás emelkedést láttunk. A SCAI gén kotranszekciója és a fehérje expressziója a α -SMA promóter aktivitásra gátló hatással volt (relatív promóter aktivitás: $4,96 \pm 0,33$ vs $2,31 \pm 0,13$, $p < 0,05$). A GFP-SCAI Δ nt kotranszekciója és expressziója ugyanakkor nem mutatott gátló hatást (relatív promóter aktivitás: $4,96 \pm 0,33$ vs $4,18 \pm 0,47$, $p = \text{NS}$). (6. ábra)



6. ábra: SCAI gátolja a TGF- β 1 indukálta α -SMA promóter aktivitás fokozódást. LLC-PK₁/AT₁ sejteket α -SMA promóter-luciferáz plazmid konstrukttal valamint SCAI-GFP illetve GFP-SCAI Δ nt expresszáló plazmiddal kotranszfektáltunk, majd a sejteket TGF- β 1-gyel kezeltük. Az α -SMA promóter aktivitásra a SCAI fehérje jelenléte gátló hatással volt, ugyanakkor a SCAI fehérje N-terminalis szakaszt nem tartalmazó GFP-SCAI Δ nt fehérje jelenléte a TGF- β 1 hatását szignifikánsan nem csökkentette (* $p < 0,05$).

4.1.3 SCAI fehérje gátolja a sejtkapcsoló struktúrák szétesése által indukált α -SMA promóter aktivitás fokozódást

Korábban vizsgálatok során munkacsoportunk kimutatta, hogy az α -SMA promóter aktivitását növeli a sejt-sejt kapcsolatok felbomlása, amelyet egy kalcium-megvonásos modellben vizsgáltunk. (Fan és mtsai 2007) Mindezek miatt vizsgálatunk következő lépésében arra kerestük a választ, hogy LLC-PK₁/AT₁ sejtekben a SCAI fehérje milyen hatással van a kalcium megvonás és az azt követő sejt-sejt kapcsolatok szétesése által indukált α -SMA promóter aktiváló hatására. A SMA-Luc plazmiddal transzfektált konfluens sejtekben a kalcium megvonás hatására több mint 8-szoros promóter aktivitás növekedés következett be. A sejtekben az GFP-SCAI overexpresszió az α -SMA promóter aktivitás növekedést mintegy 25%-kal csökkentette (relatív promóter aktivitás: $8,57 \pm 0,31$ vs. $6,18 \pm 0,35$), ami arra utal, hogy a SCAI fehérje által kiváltott gátló hatás mellett egyéb, SCAI fehérje által nem befolyásolt jelátviteli utak is szerepet játszanak a kalcium megvonás által elindított intracelluláris jelátviteli utakban. GFP-SCAI Δ nt fehérje jelenléte nem csökkentette az α -SMA promóter aktivitását (relatív promóter aktivitás: $8,57 \pm 0,31$ vs. $10,02 \pm 0,41$). (7. ábra)

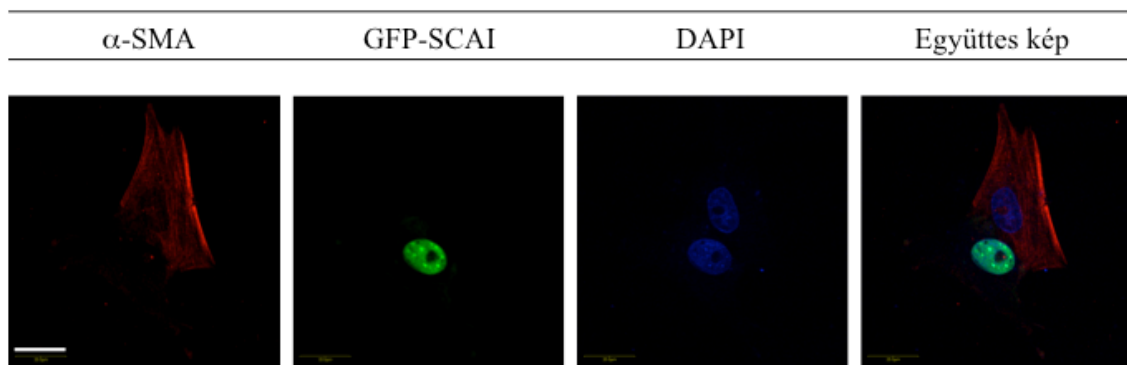


7. ábra: A SCAI fehérje részlegesen gátolja a kalcium mentes oldat használatával előidézett α -SMA promóter aktivitás növekedést. LLC-PK₁/AT₁ sejteket α -SMA promóter-luciferáz plazmid konstrukttal valamint SCAI-GFP illetve GFP-SCAIΔnt expresszáló plazmiddal kotranszfektáltunk, majd a sejteket kalcium megvonás hatásának tettük ki. Az α -SMA promóter aktivitásra a SCAI fehérje jelenléte részlegesen gátló hatással volt, ugyanakkor a SCAI fehérje N-terminális szakaszt nem tartalmazó GFP-SCAIΔnt fehérje jelenléte a kalcium megvonás hatását nem változtatta (p=NS).

4.1.4 TGF- β 1 hatására LLC-PK₁/AT₁ sejtekben termelődő α -SMA fehérje mennyisége csökken SCAI fehérje jelenlétében

A SCAI fehérje α -SMA fehérje expresszióra kifejtett hatásának értékeléséhez immunfluoreszens jelölést és konfokális mikroszkópiás vizsgálatot használtuk. LLC-PK₁/AT₁ sejteket GFP-SCAI konstrukttal transzfektáltuk, majd 3 napos TGF- β 1 kezelést alkalmaztunk. A korábbi vizsgálatok tapasztalata alapján TGF- β 1 kezelés hatására az LLC-PK₁/AT₁ sejtek mintegy 20-22%-os arányában látható α -SMA

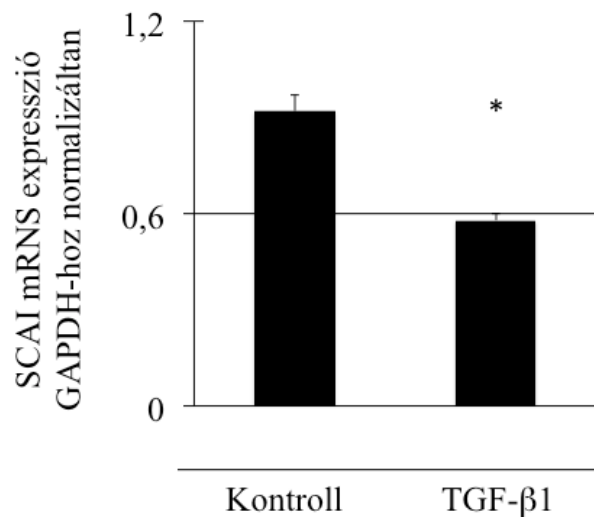
termelődés. A mostani vizsgálatok során a GFP-SCAI-val transzfektált és TGF- β 1-gyel kezelt sejtek kevesebb mint 2%-ban volt látható α -SMA expresszió. Mindez arra utal, hogy a SCAI fehérje túltermelése az TGF- β 1 indukált α -SMA fehérje expresszió csökkenését idézte elő. További eredményként említhető, hogy az N-terminális végen megrövidített (GFP-SCAI Δ nt jelzésű) SCAI jelenlétében a sejtek mintegy 26%-ban volt α -SMA expresszió TGF- β 1 kezelés hatására, amely arra utal, hogy a TGF- β 1 által kiváltott hatásához a SCAI fehérje N-terminális végének jelenléte kritikus fontosságú. (8. ábra)



8. ábra: SCAI fehérje gátolja a TGF- β 1 indukált α -SMA fehérje expressziót. Az LLC-PK₁/AT₁ sejteket a GFP-SCAI konstrukttal transzfektáltuk, majd TGF- β 1 kezelést alkalmaztunk 3 napon keresztül. A sejteket ezután fixáltuk, majd a Módszerek fejezetben leírtaknak megfelelően konfokális mikroszóppal felvételeket készítettünk. A sejtek kevesebb mint 2%-a expresszált α -SMA fehérjét a SCAI-transzfektált sejtek közül, míg a transzfektálatlan sejtek mintegy 20%-a expresszált α -SMA fehérjét. A kísérleteket két további alkalommal ismételtük meg, és összesen 240 darab véletlenszerűen választott kontroll (transzfektálatlan) sejt és 106 darab SCAI-GFP transzfektált sejtekben kifejeződő α -SMA mennyiségét vizsgáltunk. Konfokális fluorescens mikroszkópos vizsgálat, a bal alsó sarokban elhelyezkedő fehér vonal 20 μ m hosszú.

4.1.5 SCAI mRNS mennyisége csökken mIMCD-3 sejtekben TGF- β 1 kezelés hatására

További kísérleteink során a SCAI gén aktivitásának vizsgálataként a SCAI mRNS mennyiségének változását vizsgáltuk TGF- β 1 kezelés hatására. 12 óra időtartamú TGF- β 1 kezelést alkalmaztunk mIMCD-3 egér vese medulláris gyűjtőcsatorna sejteken, majd az mRNS mennyiségét mértük kontroll sejtekkel összehasonlítva. 12 órás kezelést követően a GAPDH-hoz normalizált SCAI mRNS expresszió $0,92 \pm 0,05$ volt, míg a 12 órás TGF- β 1 kezelés hatására a GAPDH-hoz normalizált SCAI mRNS expresszió $0,58 \pm 0,02$ volt. A SCAI mRNS mennyisége szignifikáns csökkenést mutatott a TGF- β 1 kezelt sejtekben ($p < 0,01$). (9. ábra)



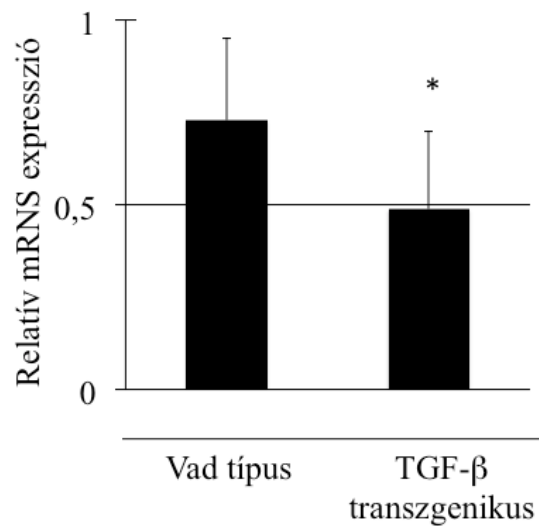
9. ábra: mIMCD sejteken 12 órás TGF- β 1 kezelés hatására RT-qPCR módszerrel mérve a SCAI mRNS mennyisége szignifikáns csökkent a kontroll sejtek mRNS mennyiségéhez hasonlítva (* $p < 0,01$).

4.1.6 SCAI mRNS expressziója csökken veseszövetben TGF- β 1 transzgenikus egérmodellben

A sejtmodelles in vitro vizsgálatokat követően egér veseszövetben expresszáldó SCAI mRNS mennyiségét mértük TGF- β 1 transzgenikus egérmodellen. Ezen egérmodell

jellegzetessége, hogy a TGF- β 1 túltermelése által már a fiatal állatokban is kifejezett fibrózis alakul ki a vesében.

TGF- β 1 túltermelés következtében 14 napos egerekben a SCAI mRNS mennyisége szignifikánsan csökkent a TGF- β 1 transzgenikus egér veseszövetben a hasonló életkorú normál egerek veseszövetéhez hasonlítva. (10. ábra)



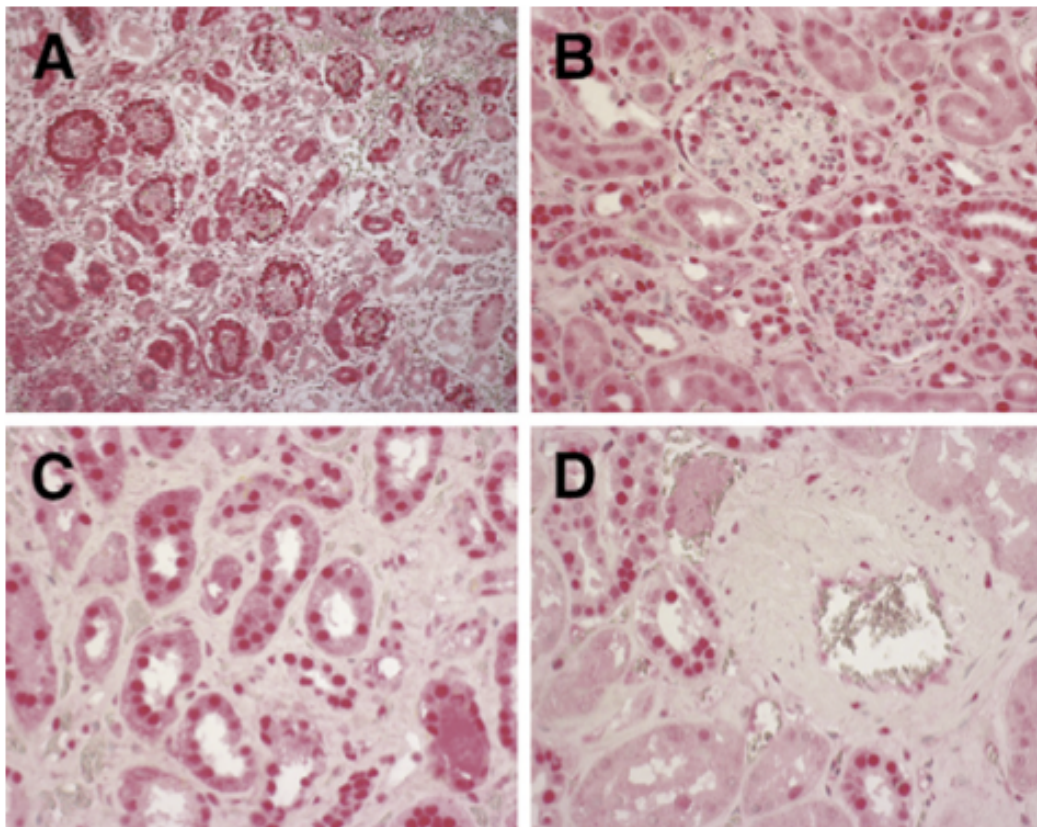
10. ábra: SCAI mRNS expressziója 14 nap életkorú normál egérből származó vesében és 14 nap életkorú TGF- β 1 transzgenikus egér vesében. SCAI mRNS mennyisége szignifikánsan alacsonyabb volt a TGF- β 1 transzgenikus egérben (* $p < 0.05$).

4.2 A SCAI fehérje humán daganatmentes és rosszindulatú daganatos szövetekben, és a SCAI fehérje szerepe egyes daganatok kialakulásában

4.2.1 SCAI fehérje kimutatható különböző életkorú humán daganatmentes vesében

A SCAI fehérje szerepére vonatkozó vizsgálatunk során humán szövetmintákon további elemzést végeztünk, melyeknek célja a SCAI fehérje humán vesében történő expressziójának feltérképezése volt. A SCAI fehérje humán veseszövetben történő kifejeződésére vonatkozólag korábban nem rendelkezünk megbízható adattal, emiatt célul tűztük ki immunhisztokémiai jelöléssel a SCAI fehérje kimutatását különböző életkorú, daganatmentes vesékben. Ezen vesékben szövettani vizsgálattal mindössze az életkorra jellemző elváltozások voltak kimutathatóak. A SCAI fehérje kimutatható volt

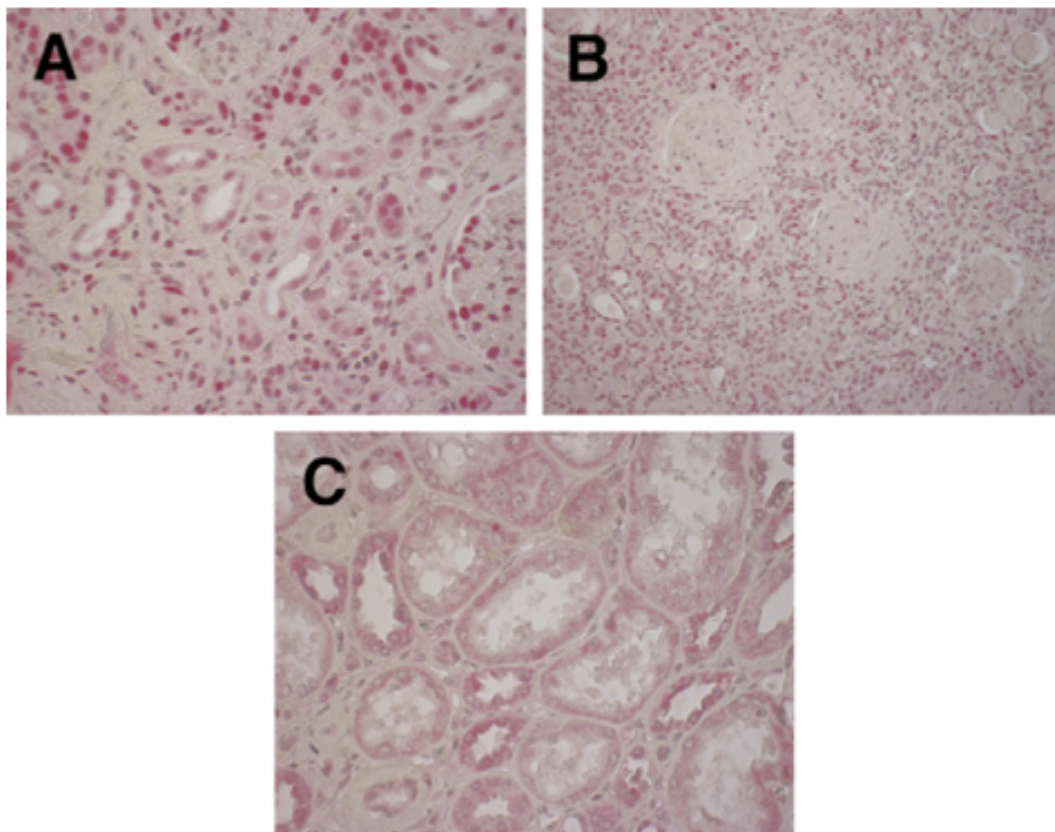
már a 20. terhességi héten a magzati vesében a glomerularis és tubuláris epitelsejtek sejtmagjaiban is. (11A. ábra) Születést követő, fiatal gyermekkori időszakból származó szövetmintában ugyancsak intenzív sejtmagi SCAI mutatható ki a glomerularusban a mezangiális sejtekben, valamint podocitákban is (4 éves fiúgyermek ép veserészlete, az alapbetegség Wilms tumor volt). (11B. ábra) Felnőtt vesében (64 éves férfi ép veserészlete, az alapbetegség vesesejtes carcinoma) elsősorban a proximális tubuláris epitelsejtekben van sejtmagi SCAI jelölődés. (11C. ábra) Ugyanezen páciensnél mindezek mellett az erek simaizomsejteiben mindössze kis mennyiségű SCAI expresszió van. Az erekben az endotelsejtekben SCAI fehérje jelölődés ugyancsak kimutatható volt. (11D. ábra)



11. ábra. SCAI fehérje expressziója különböző életkorú normál humán vesében. SCAI fehérje immunhisztokémiai jelöléssel embrionális vesében (11A. ábra, 200x nagyítás), 4 éves gyermek vesében (11B. ábra, 400x nagyítás) és 64 éves felnőtt vesében (11C és 11D. ábra, 400x nagyítás).

4.2.2 A SCAI fehérje kis mennyiségben van jelen humán daganatmentes fibrotikus veseszövetben

A fibrotikusan átalakult humán veséből származó szövetmintákban ugyancsak SCAI immunhisztokémiai jelölést használtunk annak feltérképezésére, hogy tubulointersticiális fibrózisban a SCAI fehérje miként expresszálódik. Egy 61 éves nőből származó, kórszövettanilag idült pyelonefritist mutató veséből származó szövetmintában a kiszélesedett, felszaporodott kötőszövetet tartalmazó intersticiumban SCAI-t nem expresszáló sejtes elemek voltak, míg a megmaradt tubuláris sejtekben kis mennyiségű SCAI expressziója volt kimutatható. (12A. ábra) Egy 70 éves, ugyancsak idült pyelonefritisz kórszövettani diagnózisú veséből származó mintában a szklerotikus glomerulusokban SCAI jelölődés nem volt kimutatható. (12B. ábra) A tubuláris sejtekben az előbbieken bemutatott felnőtt vesékhez hasonlóan kis mennyiségű, döntő részben sejtmagbeli SCAI fehérje volt kimutatható. (12C. ábra)

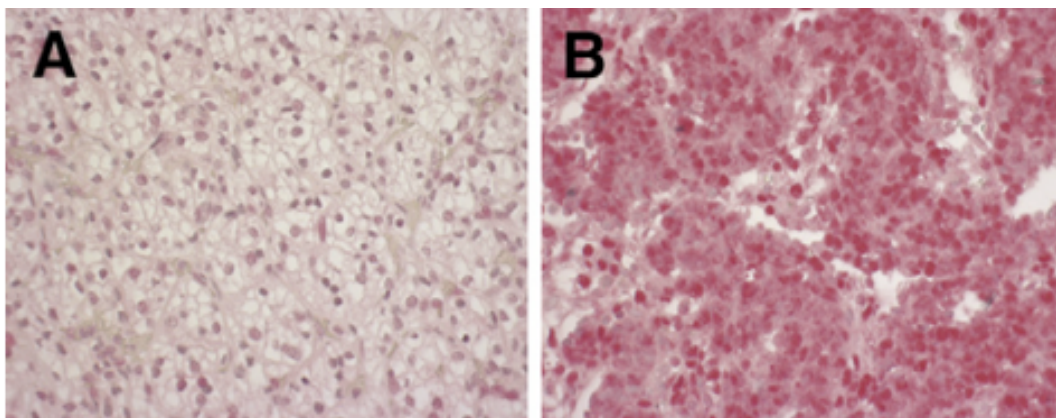


12. ábra: SCAI fehérje kifejeződés fibrotikus humán vesében. SCAI fehérje

immunhisztokémiai jelöléssel tubulointersticiális fibrózisban (12A. ábra, 400x nagyítás), glomeruloszklerózisban (12B. ábra, 200x nagyítás) és atrófiás tubulusokban (12C. ábra, 400x nagyítás).

4.2.3 A SCAI fehérje kimutatható a vese egyes malignus daganataiban

A daganatmentes vesék jellemzését követően jellegzetes gyermekkori és felnőttkori rosszindulatú vesedaganatokat is vizsgáltunk, ennek során ugyancsak a SCAI fehérje jelenlétét elemeztük. Egy 60 éves férfiből származó, kórszövettanilag világossejtes veseráknak igazolódott tumorban SCAI expresszió nem volt kimutatható (Fuhrman grade III differenciáltságú világossejtes veserák). (13A. ábra) Ugyanakkor egy 4 éves gyermektől származó, kórszövettanilag blasztéma túlsúlyos Wilms tumorban igazolódott daganatban erős intenzitású sejtmagi SCAI jelölődés volt látható (magas rizikójú Wilms tumor). (13B. ábra)

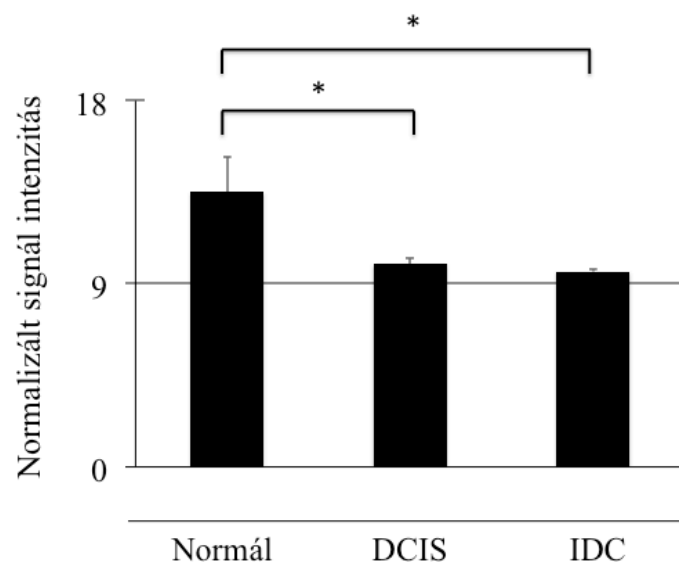


13. ábra: SCAI fehérje kifejeződése rosszindulatú humán vesedaganatban. SCAI fehérje immunhisztokémiai jelöléssel nem látható Fuhrman grade 3 differenciáltságú világossejtes veserákban (13A. ábra, 400x nagyítás). Blasztéma túlsúlyos Wilms tumorban nagyszámú daganatsejtben van sejtmagi jelölődés (13B. ábra, 400x nagyítás).

4.2.4 SCAI gén mRNS expresszió csökken az emlő malignus daganataiban génexpressziós adatbázis adatai alapján

A vese rosszindulatú daganatok típusos változatainak vizsgálatát követően további, Magyarországon gyakori rosszindulatú daganatokban is vizsgáltuk a SCAI mRNS és

fehérje kimutathatóságát. Elsőként a széles körben, szűrővizsgálattal is keresett és Magyarországon konszenzusos módszerekkel és eljárással gyógyított rosszindulatú emlőtumorokra vonatkozóan kerestünk a nyilvános emlő daganat expressziós adatbázisban (GDS3853) a SCAI gén mRNS expresszió mértékének normalizált adatait. Az adatok elemzése alapján az egészséges emlőszövet normalizált expressziós értéke $13,50 \pm 1,73$ (n=5), in situ duktális carcinoma (DCIS) csoportban $9,97 \pm 0,30$ (n=9), és duktális típusú invazív emlőkarcinóma (IDC) csoportban $9,61 \pm 0,12$ (n=5) volt. Mindezek alapján a típusos és gyakori in situ duktális és invazív emlőrákban a SCAI mRNS expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt az egészséges emlőszövethez hasonlítva. (14. ábra)

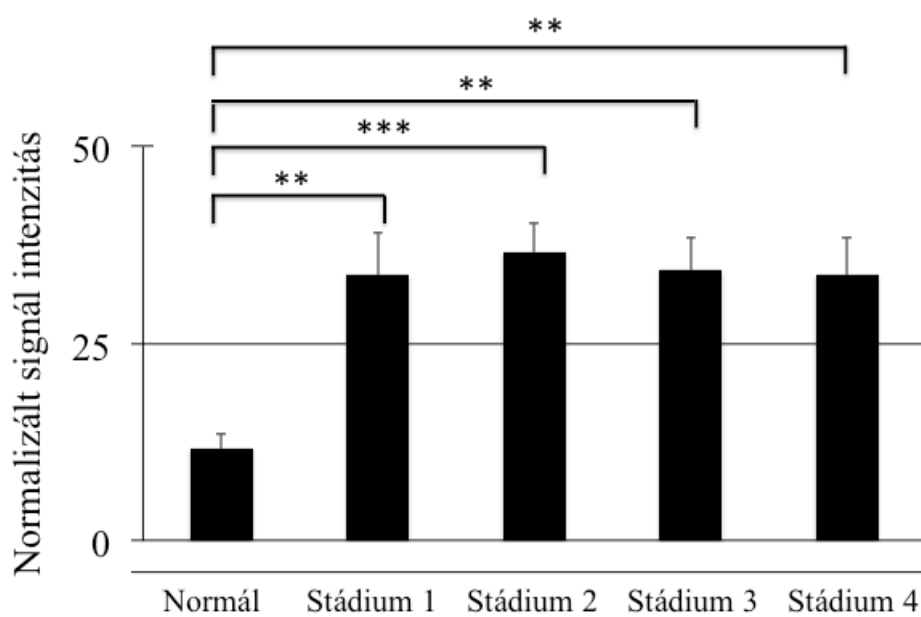


14. ábra: SCAI gén expresszió összehasonlítása emlő daganat expressziós adatbázisból (GDS3853) származó adatokból: egészséges emlőszövet (n=5), in situ duktális carcinoma (DCIS, n=9), és duktális típusú invazív emlőkarcinóma (IDC, n=5). SCAI mRNS expresszió szignifikánsan alacsonyabb mértékű az emlő malignus tumorokban az egészséges szövethez hasonlítva (* $p < 0,05$, Kruskal-Wallis és Dunn's többszörös összehasonlító comparison teszt)

4.2.5 SCAI gén mRNS expresszió növekedik vastagbél malignus daganatban génextpressziós adatbázis adatai alapján

További vizsgálatunk során a népbetegségnek tekinthető rosszindulatú vastagbél

daganat expressziós adatbázisból (GSE21815) származó adatokat értékeltük a SCAI gén expresszióra vonatkozólag. Az egészséges vastagbélben a SCAI mRNS normalizált expressziós értéke $11,67 \pm 1,91$ (n=9), az 1-es stádiumú rosszindulatú vastagbél daganat expressziós értéke $33,68 \pm 5,29$ (n=13), a 2-es stádium (T2) esetén $36,59 \pm 3,74$ (n=26), a 3-es stádium (T3) esetén $34,28 \pm 4,22$ (n=17), a 4-es stádium (T4) esetén $33,68 \pm 4,84$ (n=10) volt. Mindezek alapján valamennyi rosszindulatú vastagbél szövetben a SCAI mRNS mennyisége szignifikánsan emelkedett volt a normál vastagbél szövethez hasonlítva (15. ábra)

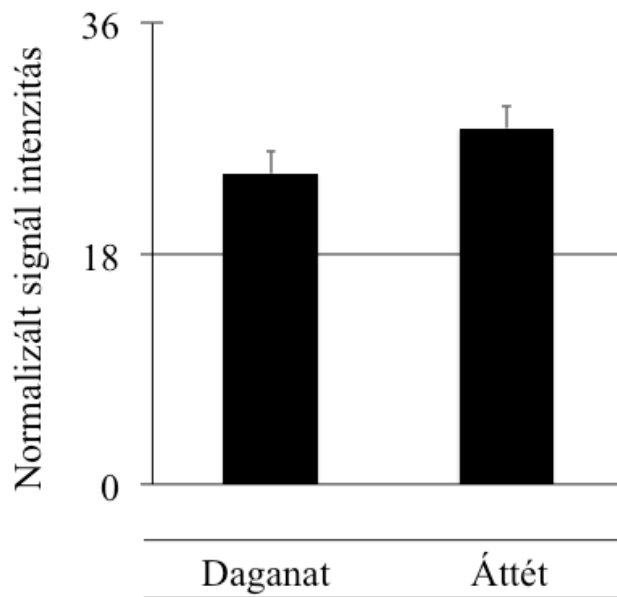


15. ábra: SCAI gén expresszió összehasonlítása vastagbél daganat expressziós adatbázisból (GSE21815) származó adatokból: egészséges vastagbél nyálkahártya (n=9), vastagbél rosszindulatú daganat, 1-es stádium (T1) (n=13), 2-es stádium (T2) (n=26), 3-es stádium (T3) (n=17), 4-es stádium (T4) (n=10). SCAI mRNS expresszió szignifikánsan emelkedett az vastagbél malignus daganatban az egészséges nyálkahártyához hasonlítva (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Kruskal-Wallis és Dunn's többszörös összehasonlító teszt)

4.2.6 SCAI gén mRNS expresszió hasonló mértékű a vastagbél primer malignus daganatban és annak áttétében génexpressziós adatbázis adatai alapján

A vastagbél daganatok áttétképző hajlamának és a SCAI gén expresszió szerepének

tisztázására további adatbázis elemzést végeztünk vastagbél áttétet adó daganat expressziós adatbázisból (GDS4393) származó adatokból. A vastagbél elsődleges rosszindulatú daganat normalizált SCAI mRNS expressziós értéke $24,48 \pm 1,68$ (n=33) volt, a vastagbél rosszindulatú daganat áttét normalizált értéke $27,82 \pm 1,66$ (n=21) volt, tehát a SCAI mRNS expresszió nem különbözött szignifikáns értékben a két csoport között. (16. ábra)

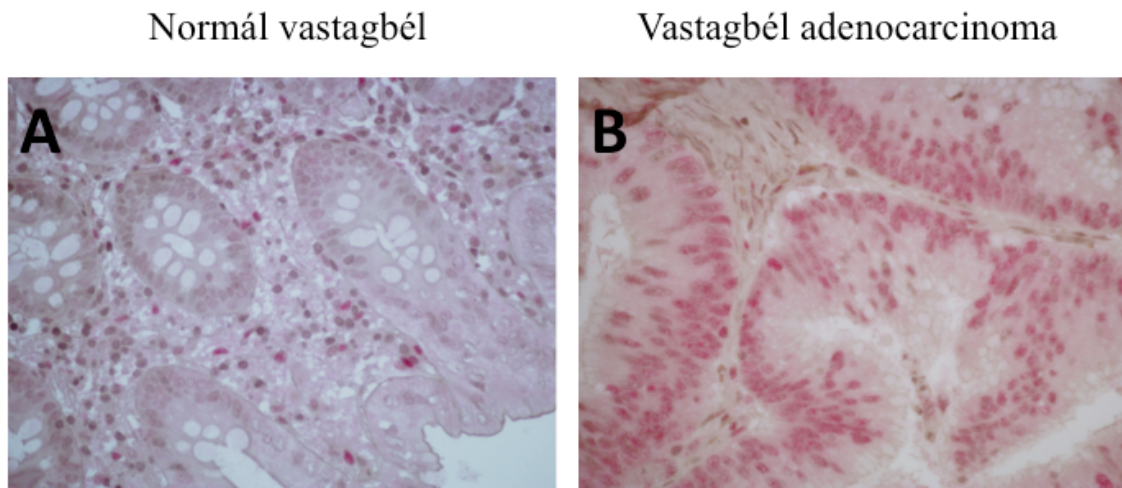


16. ábra: SCAI gén expresszió összehasonlítása vastagbél áttétes daganat expressziós adatbázisból (GDS4393) származó adatokból: vastagbél elsődleges rosszindulatú daganat (n=33) és vastagbél rosszindulatú daganat áttéte (n=21). A SCAI mRNS expresszió nem különbözik szignifikáns mértékben az elsődleges rosszindulatú daganat csoportja és rosszindulatú daganat áttétének csoportja között. (p=NS, Kruskal-Wallis és Dunn's többszörös összehasonlító teszt)

4.2.7 A SCAI fehérje kimutatható vastagbél malignus daganatban

Az előzőekben leírt adatbázisokon végzett “in silico” SCAI expressziós elemzéseket követően a SCAI fehérje rosszindulatú vastagbél daganatból történő kimutatásának lehetőségét vizsgáltuk, ehhez 9 páciens rosszindulatú vastagbél daganatából származó szövetminta részleteit értékeltük. A SCAI fehérje kifejeződés mértékét a Módszerek fejezetben leírt H-score-ral értékeltük. A kapott eredményeket, valamint a 9 páciens

alapvető adatait az 2. táblázatban foglaltuk össze. Az egészséges nyálkahártyában a SCAI nukleáris kifejeződése gyenge volt, a H-score értékek 0 és 4,7 között voltak. (17A. ábra) A vastagbél rosszindulatú daganatban a SCAI fehérje kifejeződése erőteljesebb volt, a H-score értékek 4,64 és 67,61 között voltak. (17B. ábra)



17. ábra: SCAI fehérje sejtmagbeli kimutatása vastagbél egészséges nyálkahártyában (17A. ábra, 400x nagyítás) és adenokarcinómában (17B ábra, 400x nagyítás).

2. táblázat: A 9 rosszindulatú vastagbél daganatos páciens adatai.

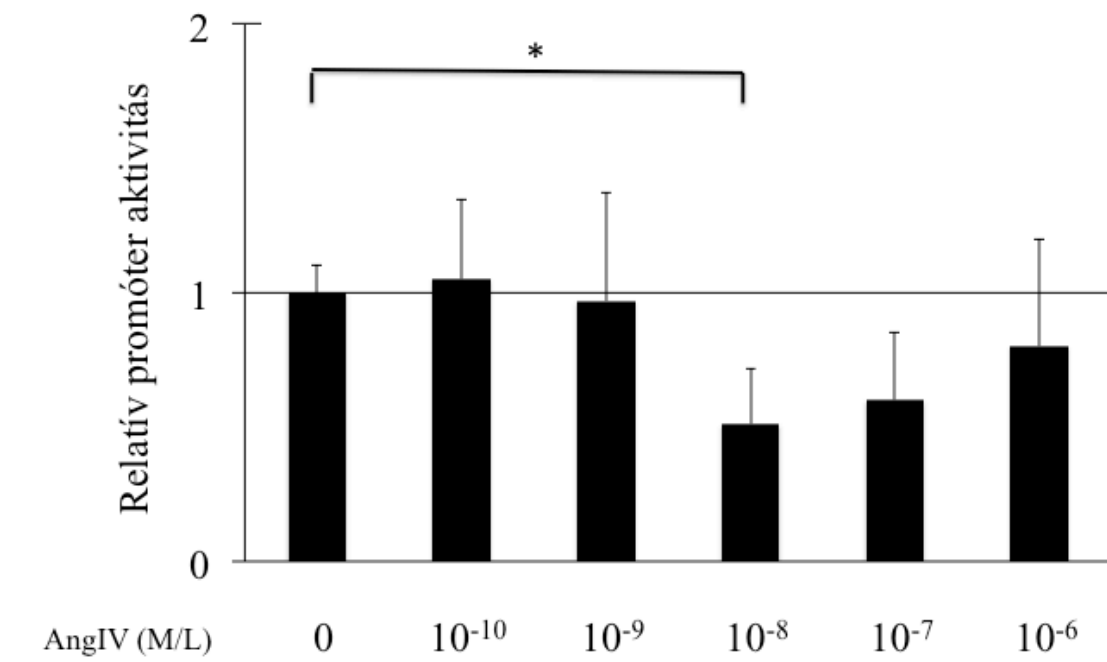
Páciens	Nem	Életkor	Daganat helye	Grade	T	N	Dukes	MAC	Ave H score Normál	Ave H score Daganat
1	férfi	84	coecum	2	3	0	B	B2	1.33	31.83
2	nő	74	sigma	2	3	0	D	D	0.10	4.64
3	nő	59	descendens	2	3	1	C	C2	0.00	26.71
4	nő	57	flex.hepatica	3	3	0	B	B2	0.40	16.37
5	férfi	73	ascendens	2	3	0	B	B2	1.20	11.40
6	nő	66	ascendens	3	3	2	D	D	3.28	15.71
7	nő	53	coecum	2	3	2	C	C3	2.82	29.19
8	nő	67	sigma	2	3	1	D	D	4.70	67.61
9	nő	75	rectum	2	3	2	C	C3	1.53	34.29

Ave H score Normál: átlagos H score normál vastagbél szövetben;
Ave H score Tumor: átlagos H score vastagbél daganat szövetben.

4.3 A renin-angiotenzin rendszerhez tartozó AngIV hatása az ECM homeosztázisban szerepet játszó PAI-1 mennyiségnek szabályozására

4.3.1 Angiotenzin IV nem növeli a PAI-1 promóter aktivitást

A PAI-1 fehérje szerepének vizsgálata során első lépésként annak megválaszolását terveztük, hogy az AngIV vajon hatással van-e sejtmmodellünkben a PAI-1 promóter aktivitására. Mindezek céljából PAI-1 promóterhez kötött luciferáz enzimet kódoló plazmid tranziens transzfekcióját végeztük LLC-PK₁/AT₁ sejtekben, majd hordozóanyaggal (vechikulum) és különböző koncentrációjú (10^{-10} M/L – 10^{-6} M/L) AngIV-gyel kezeltük a sejteket. Ennek során a PAI-1 promóter aktivitás emelkedést nem láttunk, mindössze a 10^{-8} M/L koncentráció esetén volt a PAI-1 promóter relatív aktivitása $0,51 \pm 0,21$ értékű, amely ugyan szignifikáns mértékű csökkenés volt, azonban ez összességében nem volt konzisztens változásként értelmezhető. (18. ábra)

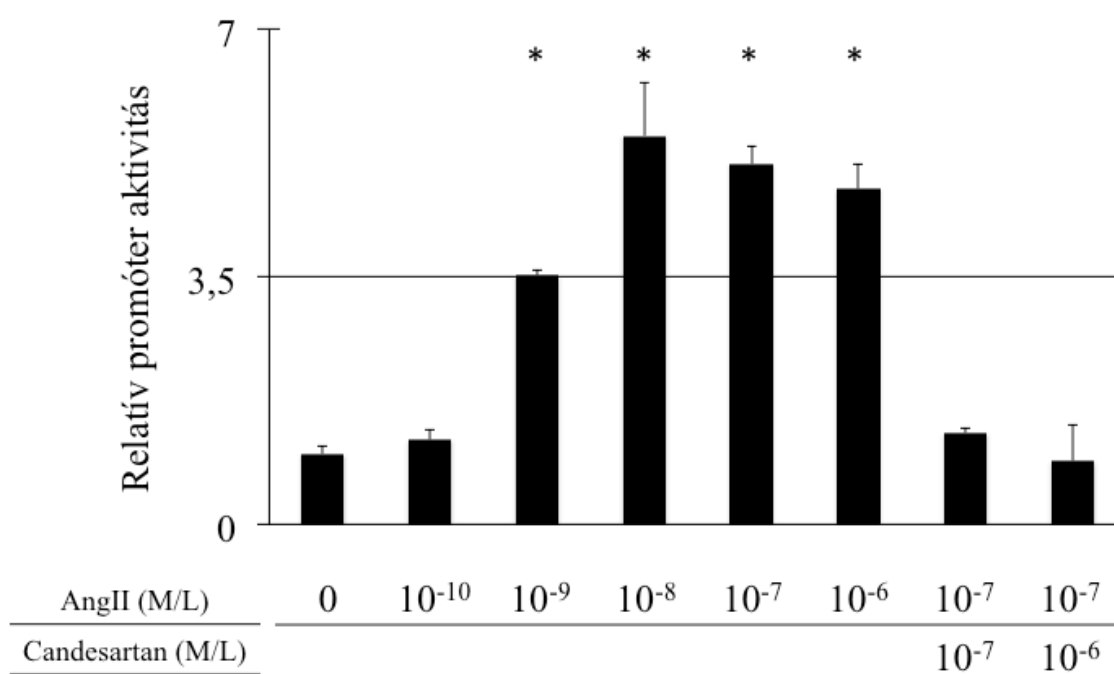


18. ábra: AngIV hatására a PAI-1 promóter aktivitása lényegében nem csökken LLC-PK₁/AT₁ sejtekben. Hordozóanyaggal és 10^{-10} M/L – 10^{-6} M/L koncentrációjú AngIV-gyel kezelt sejtekben a PAI-1 promóter aktivitás szigifikánsan nem változott, csupán a 10^{-8} M/L koncentrációjú AngIV hatására csökkent a PAI-1 promóter aktivitása. (*)

p<0,05)

4.3.2 Angiotenzin II dózisfüggő módon növeli a PAI-1 promóter aktivitását AT₁ receptoron (AT₁R) keresztül

A következő kísérletben LLC-PK₁/AT₁ sejteket tranziensen transzfektáltunk PAI-1 promóterhez kötött luciferáz enzimet kódoló plazmiddal, majd a sejteket vechikulummal illetve különböző koncentrációjú (10^{-10} M/L – 10^{-6} M/L) AngII-vel kezeltük. A kísérlet során a PAI-1 promóter aktivitás dózisfüggő növekedését tapasztaltuk. A PAI-1 promóter aktivitása már 10^{-9} M/L AngII koncentráció esetén is szignifikánsan emelkedett, és 10^{-8} M/L AngII koncentrációnál volt a legnagyobb promóter aktivitás emelkedés, a PAI-1 relatív promóter aktivitása $5,66 \pm 0,69$, volt ($P < 0,01$ a vechikulummal kezelthez hasonlítva). AT₁R gátló candesatran 10^{-7} M/L és 10^{-6} M/L koncentrációjú előkezeléssel az AngII által kiváltott hatás teljes gátlása volt kimutatható (relatív promóter aktivitás: $0,85 \pm 0,51$, $p = \text{NS}$ a vechikulummal kezelthez hasonlítva). Mindez arra utal, hogy az AngII által kiváltott PAI-1 promóter aktivitás növekedés AT₁R-on keresztül, dózisfüggő módon történt. (19. ábra)

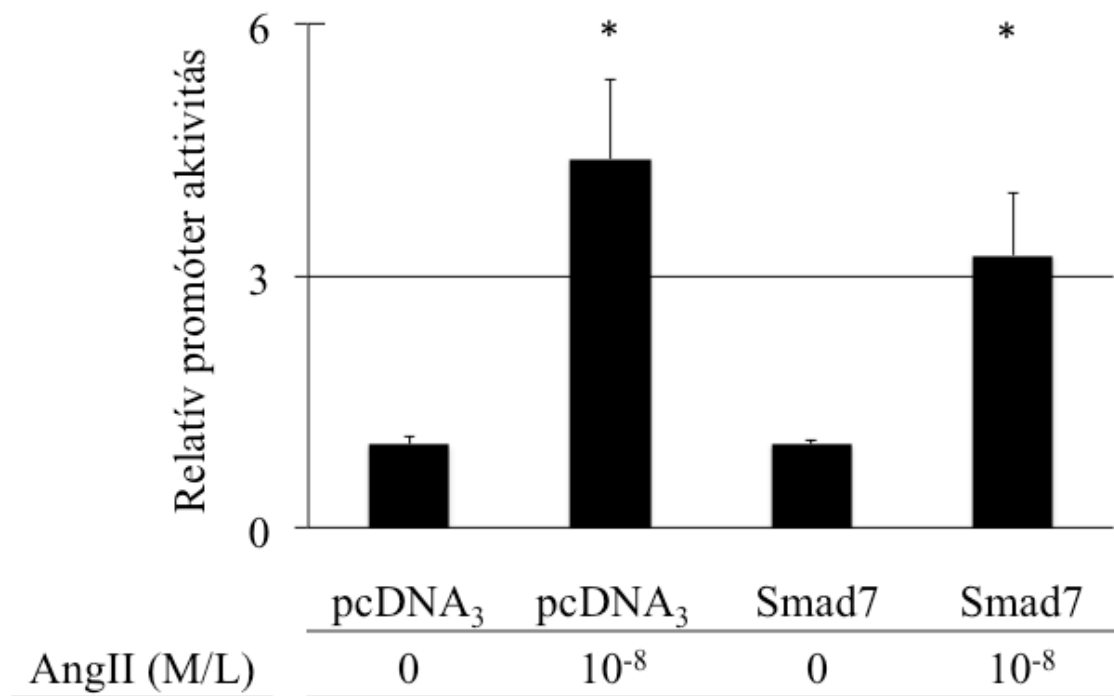


19. ábra: AngII dózisfüggő módon növeli a PAI-1 promóter aktivitását LLC-PK₁/AT₁ sejtekben, és ezt a hatás AT₁R gátló candesartan kivédi. A sejteket PAI-Luc konstrukttal

transzfektáltuk, majd 10^{-10} M/L – 10^{-6} M/L koncentrációjú AngII-vel kezeltük. A PAI-1 promóter aktivitása 10^{-9} M/L – 10^{-6} M/L koncentrációjú AngII esetén szignifikánsan emelkedett. 10^{-7} M/L – 10^{-6} M/L koncentrációjú AT₁R gátló candesartan előkezeléssel az AngII hatása kivédhető volt, a PAI-1 promóter aktivitás emelkedés ekkor nem szignifikáns a kontrollhoz képest. (* $p < 0,05$)

4.3.3 AngII PAI-1 promóter aktiváló hatása független a TGF- β 1 jelátviteli útban gátló hatású Smad7 jelenlététől

Eddigi vizsgálataink azt igazolták, hogy az AngII által kiváltott PAI-1 promóter aktiválás közvetlenül AT₁R-on keresztül történik LLC-PK₁/AT₁ sejtekben. Ugyanakkor korábbi vizsgálatok azt mutatták, hogy a PAI-1 promóter aktivitást TGF- β 1 is növelheti. (Keeton és mtsai 1991, Westerhausen és mtsai 1991, Chang és Goldberg 1995) Az AngII és a TGF- β 1 együttes hatásának vizsgálata céljából a sejteket a PAI-1 promóter-luciferáz komplexet expresszáló vektor mellett egy üres expressziós vektort (pcDNA3.1) illetve Smad7 fehérjét kódoló expressziós vektort is ko-transzfektáltunk. A Smad7 fehérje a TGF- β 1 intracelluláris jelátvitelében gátló hatásúként működik. A Smad7 expressziós vektor ko-transzfekciót követően az 10^{-8} M/L koncentrációjú AngII hatására a PAI-1 promóteraktivitás növekedési mértéke kissé csökkent, azonban a csökkenés nem volt statisztikailag szignifikáns (relatív promóter aktivitás: $4,44 \pm 0,98$ vs $3,30 \pm 0,70$, $p = \text{NS}$). (20. ábra)

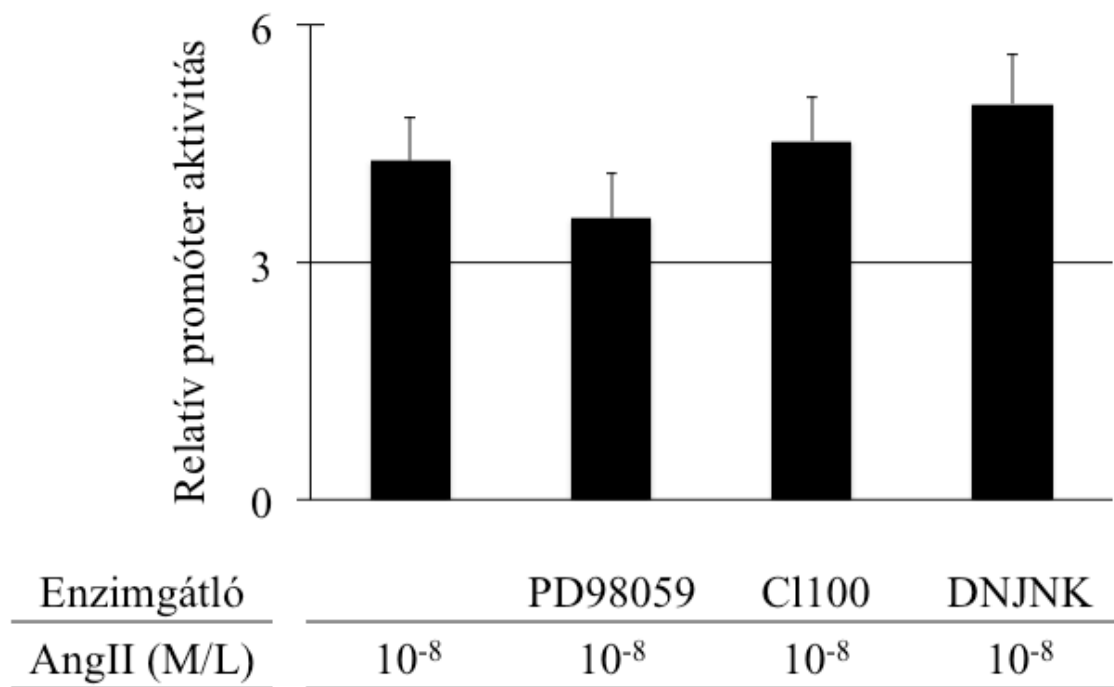


20. ábra: Az AngII PAI-1 promóter aktivitást növelő hatását LLC-PK₁/AT₁ sejtekben a TGF- β 1 jelátvitelét gátló hatású Smad7 nem befolyásolta. A sejteket PAI-Luc konstrukttal és üres pcDNA3.1 illetve Smad7 fehérjét kódoló vektorral kotranszfektáltuk, majd AngII kezelést alkalmaztunk. Az AngII PAI-1 promóter aktiváló hatását a Smad7 fehérje overexpressziója nem csökkentette. (* $p < 0,05$)

4.3.4 Az AngII PAI-1 promóter aktiváló hatásában sem az ERK, sem a JNK nem vesz részt

Az AngII számos intracelluláris jelátviteli úton keresztül regulálja különböző gének expresszióját. Ezen jelátviteli utak közül az egyik a protein kináz C (PKC) útvonal, és emellett a MAPK kaszkád további elemei is részt vesznek: az extracelluláris szignál regulálta kináz (ERK1/2), valamint a c-jun N-terminalis kináz (JNK) is. (Huszár és mtsai 2001, Schmitz és mtsai 2001, Terebessy és mtsai 2004) Korábbi vizsgálataink azt mutatták, hogy az AngII az ERK1/2 és a JNK kináz kaszkádokat LLC-PK₁/AT₁ sejtekben AT₁R által aktiválja. (Huszár és mtsai 2001, Terebessy és mtsai 2004) Mostani vizsgálatunk során azon kérdést fogalmaztuk meg, hogy a PAI-1 promóter AngII által indukált aktivációjában mely MAPK vesz részt. Elsőként MEK gátló PD98059-vel (6×10^{-5} M/L koncentrációban) 45 percig előkezeltük a sejteket, majd 10^{-8}

⁸M/L AngII stimulációt alkalmaztunk. A PAI-1 relatív promóter aktivitás PD98059 nélkül $4,29 \pm 0,54$ volt, míg PD98059 jelenlétében $3,56 \pm 0,57$ volt ($p=NS$). Mindezek alapján a MEK gátló PD98059 nem gátolta a PAI-1 promóter aktivitás fokozódását. Egy másik kísérletben az LLC-PK₁/AT₁ sejteket ERK gátló C1100 foszfatazt, és a JNK utat gátló DN-JNK-t expresszáló vektor kotranszfekcióját végeztük. Mindkét esetben az AngII által előidézett PAI-1 promóter aktivitást nem befolyásolta az CL100 és a DN-JNK fehérjék overexpressziója, és intracelluláris jelenléte. (21. ábra)

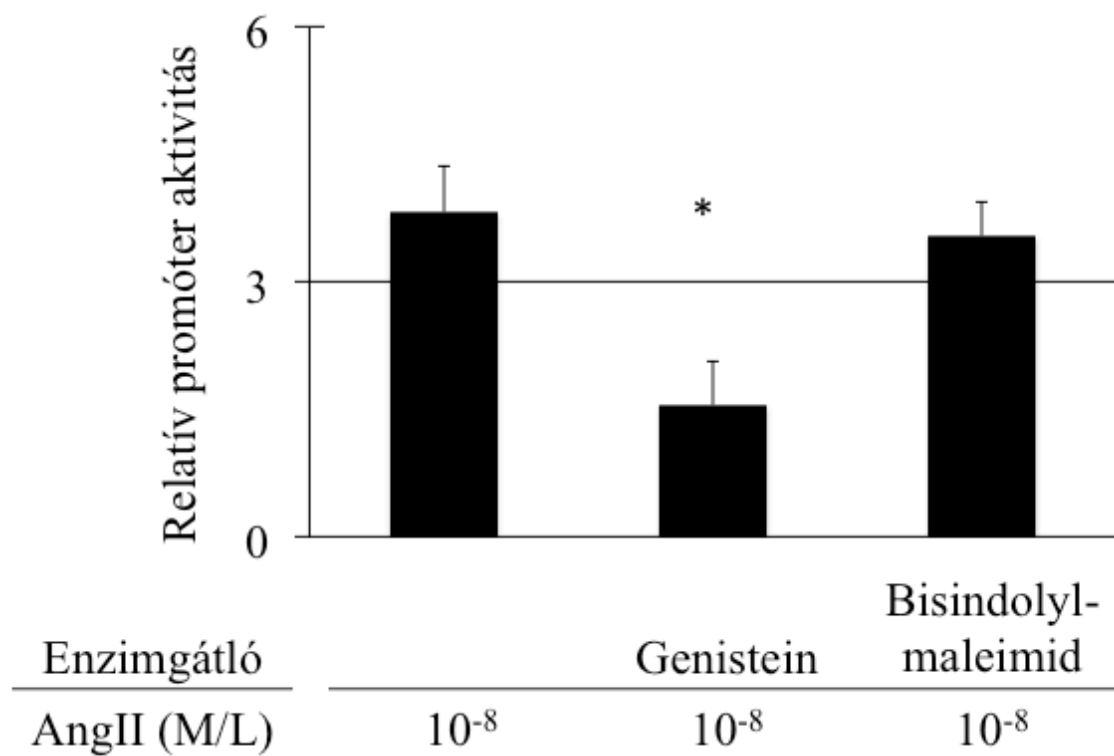


21. ábra: Az AngII PAI-1 promóter aktiváló hatását sem az MEK gátló PD98059, sem az ERK gátló C1100, sem a JNK gátló DN JNK nem befolyásolja LLC-PK₁/AT₁ sejtekben. A sejteket PAI-1-Luc vektorral transzfektáltuk, és MEK gátló PD98059-val előkezeltük, illetve EKR gátló C1100 és JNK gátló DN JNK overexpressziáló vektort kotranszfektáltunk. 10⁻⁸M/L AngII stimulust alkalmaztunk. Az alkalmazott intracelluláris jelátviteli gátlók az AngII hatását szignifikánsan nem befolyásolták.

4.3.5 Az AngII PAI-1 promóter aktiváló hatásában tirozin-kinázok vesznek részt, azonban ezek között a protein kináz C (PKC) nem szerepel

Az AngII által indított sejten belüli jelátviteli utak közül számos protein kináz

aktiválódik. Ennek vizsgálatára genistein nevű, széles spektrumú tirozin kináz gátlót 10^{-4} M/L koncentrációban használtunk az LLC-PK₁/AT₁ sejtekben. Genistein előkezelést követően az AngII indukálta PAI-1 promóter aktivitás szignifikánsan csökkent ($3,82 \pm 0,55$ vs $1,55 \pm 0,52$, $P < 0,05$). Ezt követően a PKC szerepét vizsgáltuk, amely fontos szerepet játszik az AngII által előidézett intracelluláris kalcium koncentrációnövekedéshez társulva. Az LLC-PK₁/AT₁ sejteket specifikus PKC inhibitorral, bisindolyl-maleimiddel (5×10^{-7} M/L) előkezeltük, majd a sejteket 10^{-8} M/L AngII-vel stimuláltuk. Az előkezelés nem volt hatással az AngII PAI-1 promóteraktiváló hatására ($3,82 \pm 0,55$ vs. $3,54 \pm 0,40$, $p = \text{NS}$). (22. ábra)



22. ábra: LLC-PK₁/AT₁ sejtekben az AngII indukálta PAI-1 promóter aktivitás fokozódást a széles spektrumú tirozin-kináz gátló genistein csökkenti, azonban a PKC gátló bisindolyl-maleimid nincs hatással ezen aktiváló hatásra. PAI-1-Luc vektor transzfekcióját követően tirozin-kináz gátló genistein (10^{-4} M/L) és PKC gátló bisindolyl-maleimid (5×10^{-7} M/L) előkezelést alkalmaztunk, majd 10^{-8} M/L AngII stimulust használtunk. A PAI-1 promóter aktivitás növekedést a tirozin-kináz gátló genistein szignifikánsan csökkentette, azonban a PKC gátló bisindolyl-maleimid nem befolyásolta.

5 Megbeszélés

Dolgozatomban a TGF- β 1 és AngII által előidézett vesefibrózis és EMT kialakulásával, valamint egyes rosszindulatú tumorokban kifejeződő SCAI fehérje kimutathatóságát, és hatásának egyes lépéseit vizsgáltam számos módszerrel.

Kísérleteink első részében in vitro sejtmoddellen a SCAI fehérje kimutathatóságát, és az EMT-re jellemző α -SMA fehérje termelésben betöltött szerepét vizsgáltuk.

Immunfluoreszcens mikroszkópos módszerrel vizsgálva a SCAI fehérje LLC-PK/AT₁ sertés proximális tubuláris epitelsejtekben elsősorban a sejtmagban volt detektálható, ugyanakkor az N-terminálison megrövidített SCAI fehérje számottevő mértékben a citoplazmában volt kimutatható, és a sejtmagban nem volt jelen érdemi mennyiségben.

A LLC-PK/AT₁ sejtekben azt is láttuk, hogy a SCAI fehérje gátolta a TGF- β 1 indukálta és az intercelluláris kontaktusok szétesése által előidézett α -SMA promóter aktivitást, és ezáltal a SCAI fehérje gátolta az α -SMA fehérje termelődést is. Ugyanezen gátló hatás azonban nem volt kimutatható a SCAI fehérje N-terminális végének hiánya esetén. Mindezek arra is utalnak, hogy tubuláris epitelsejtekben az N-terminális vég fontos szerepet játszik a SCAI sejtmagbéli megjelenésében és működésében.

A SCAI fehérje TGF- β 1 által előidézett α -SMA fehérje termelés vizsgálatára LLC-PK/AT₁ sejteket ismételt immunfluoreszcens mikroszkópos módszerrel vizsgáltuk. A sejtekben GFP-vel megjelölt SCAI fehérjét overexpresszáltunk. A SCAI fehérje overexpresszió hatására az LLC-PK/AT₁ sejtekben az TGF- β 1 által indukált α -SMA termelés szignifikánsan csökkent, és a sejtek kevesebb mint 2%-ban volt mindössze SMA kimutatható. Mindezen in vitro kísérletek arra utalnak, hogy a SCAI fehérje fontos szerepet játszik a TGF- β 1 által előidézett EMT folyamatában.

Következő lépésként a SCAI gén aktivitását vizsgáltunk különböző modellekben, és ehhez a SCAI mRNS mennyiségének mérését végeztük, és vizsgáltunk a SCAI mRNS mennyiségének TGF- β 1 hatására bekövetkező változását. In vitro sejtmoddellben és in vivo állatmodellben is igazoltuk, hogy TGF- β 1 hatására a SCAI mRNS mennyisége csökken, amely alapján megerősítettük, hogy a SCAI gén expressziós aktivitása csökken a TGF- β 1 által szabályozott EMT folyamata során.

A SCAI fehérje előbbieken leírt működése endogén gátló hatású kofaktornak felel meg, amely ezáltal a TGF- β 1 függő α -SMA termelést szabályozza. Az α -SMA fehérje

promóterében CAR β domének vannak, amelynek szabályozásában az MRTF-ek részt vesznek. (Shimizu és mtsai 1995, Hinson és mtsai 2007) TGF- β 1 hatására az MRTF a sejtmagba transzlokálódik, és az MRTF specifikus gátlása következtében az α -SMA termelése is gátlódik. (Fan és mtsai 2007, Elberg és mtsai 2008) Ez a mechanizmus magyarázhatja a SCAI-nak, mint az MRTF endogén gátló hatású kofaktorának, szerepét a TGF- β 1 szignálok modulálásában. További megerősítő adatnak tekinthető az is, hogy a TGF- β 1 hatására a SCAI mennyisége közvetlenül is csökken, amely fehérjecsökkenés az α -SMA termelés egyik közvetlen endogén gátló hatású tényező hatásának csökkenését is jelenti.

A SCAI génexpresszió szabályozási mechanizmus bemutatását követően a SCAI fehérje kimutathatóságára tettünk kísérletet humán szövetmintákban.

A SCAI fehérje humán szövetben a lép kivételével a belső szervekben megtalálható, legnagyobb mennyiségben a vastagbélben és az epehólyagban mutatható ki. A veseszöveten belüli pontosabb elhelyezkedésére vonatkozó kevés információ bővítése céljából vizsgáltunk különböző életkorú humán veseszövetmintákat. Ép humán veseszövetben már a 20. terhességi hét életkorú vesében a glomeruláris sejtek sejtmagjaiban nagy mennyiségben kimutatható a SCAI fehérje, és fiatal gyermekkorban is intenzív sejtmagi jelölődés látható. Idősebb korban a tubuláris epithélisejtekben látható SCAI fehérje, elsősorban sejtmagban mutatható ki.

A vesefibrozist előidéző különböző folyamatok végállapotának tekinthető intersticiális fibrozisban döntő részben intersticiális sejtek maradnak, melyekben a SCAI fehérje minimális mennyiségben volt kimutatható. Mindezen kísérletek eredményei arra utalnak, hogy a SCAI fehérje jelentős szerepet tölthet be a vesefibrozis folyamatában.

A SCAI fehérjét legelőször daganatkeletkezésével kapcsolatban írták le, így a következő lépésekben figyelmünket a SCAI fehérje néhány jellegzetes humán daganat szövetben történő kimutathatóságának kérdésére irányítottuk.

A legjellegzetesebb gyermekkori vese daganatban (Wilms-tumor) nagy mennyiségű SCAI fehérje volt látható, míg a jellegzetes felnőttkori vese daganatban (világossejtes veserák) a SCAI fehérje nem volt kimutatható. Ezen SCAI fehérje expressziós mintázat a különböző daganatok esetén a hasonló életkorú daganatmentes szövetre emlékeztetett. Ezen megfigyelés arra is utalhat, hogy a két tumor jellege alapvetően különböző lehet - a Wilms tumor esetén egy korai, embrionális jellegű tumorról van szó, addig a

világossejtes veserák egy későbbi, felnőtt korban kialakuló rosszindulatú daganat. A SCAI expresszió ilyen mérvű különbsége a tumor kialakulásában szerepet játszó sejtek életkorának és egyéb állapotának függvénye lehet. Ezen tényezők felvetik a SCAI fehérje organogenezisben betöltött központi szerepének lehetőségét is, valamint annak kérdését, hogy az életkor előrehaladtával a SCAI fehérje expressziója milyen okok miatt csökken. Mindezen adatok összességében arra is utalhatnak, hogy a SCAI fehérje jelentősége elsősorban a tumor kialakulásának kezdeti lépéseinél lehet fontos. (Kressner és mtsai 2013)

A SCAI fehérje daganatok kifejlődésében betöltött szerepének vizsgálatához a szakirodalomban eddig leírt daganattípusoktól eltérő két rosszindulatú daganattípust választottunk, amelyek Magyarországon népbetegségnek tekinthetők. “In silico” vizsgálataink az emlő szokványos invazív daganata és in situ daganat esetén is a SCAI mRNS mennyiségének csökkenését igazolták. Érdekes módon a vastagbél típusos rosszindulatú daganata esetén a SCAI mennyiségének növekedése volt látható az “in silico” génexpressziós adatok elemzésekor és a SCAI fehérje immunhisztokémiai módszerrel történő kimutatása esetén is.

Az ellentmondásos adatok háttérben génexpressziós szabályozási eltérések, valamint egyéb tényezők is állhatnak. Érdekes, hogy a Wilms-tumorban mint embrionális jellegű tumorban, illetve a sok osztódó őssejtet tartalmazó vastagbélből kiinduló rosszindulatú daganatban is magas SCAI expresszió volt kimutatható. Számos olyan fehérje került már leírásra, amely kettős hatással van a tumor keletkezés folyamatára. Ezek egyik példája a vérképzőszervi megbetegedésekben jól leírt ilyen proto-onkogén Notch fehérje, amelynek tumorsuppresszor hatására vonatkozólag az utóbbi időben növekvő adat áll rendelkezésre. (Lobry és mtsai 2011)

A SCAI fehérje vesén kívüli más szervrendszerekbeli működésére vonatkozóan még kevés adattal rendelkezünk. A központi idegrendszerben az újabb vizsgálatok alapján a SCAI a patkány dendritikus idegsejtek közötti kapcsolatokat befolyásolja. A TGF- β családba tartozó aktivin hatására a patkány neuronok közötti kapcsolatok száma és komplexitása növekedett, amely folyamathoz az SRF és MRTF fehérjék jelenléte is szükséges volt. Aktivin hatására a SCAI mennyisége csökkent az idegsejtek sejtmagjában, és növekedett a citoplazmában. A SCAI overexpressziója gátolta az

aktivin indukálta SRF transzkripció aktivitást és a dendritikus kapcsolatok komplexitását. (Ishikawa és mtsai 2010)

A jóindulatú központi idegrendszeri tumorszövetek közül SCAI mRNS és protein mennyisége csökken glioma tumorszövetben, és gliomából származó sejtvonalakban. SCAI fehérje túltermelődése gátolja a glioma sejtmodellekben az invázió mértékét. A SCAI fehérje termelődésének csökkenése intracellulárisan aktiválja a más sejtekben is már korábban leírt Wnt/ β -catenin jelátviteli utat. Továbbá a SCAI fehérje befolyásolja az EMT-t szabályozó Snail1 és TWIST fehérjék mennyiségét is. (Chen és mtsai 2014)

A Wnt/ β -catenin EMT-ben betöltött szerepe miatt ezen megfigyelés is megerősített bennünket abban, hogy a SCAI valóban jelentős „kapuőr” szerepet tölthet be az EMT kialakulásának kezdeti fázisaiban. Fontos itt megjegyezni, hogy irodalmi adatok alapján további kulcsfontosságú EMT-t okozó transzkripció faktorok is a SCAI fehérje által szabályozottak, mint a TWIST és a Snail1. (Chen és mtsai 2014)

Állatkísérletes modellben SCAI génkiütött egerek szokványos időben születtek meg, amellyel igazolható volt, hogy a SCAI nem esszenciális gén az egér egyedfejlődéshez. Ugyanakkor infravörös sugárzásnak kitett egerek esetén a halálozás korábban következett be a normális genetikai állományú egerekhez képest. Ennek magyarázatául Hansen és munkatársai a SCAI fehérje a kettős szálú DNS javító mechanizmusában betöltött szerepét igazolták. Emellett a SCAI génkiütött egerekben mind a here, mind a petefészek alulfejlettsége volt megfigyelhető, amely alacsonyabb fokú utódnemző képességgel és mindkét nemben károsodott funkciójú csírasejtekkel társult a kontroll állatsoportéhoz viszonyítva. (Hansen és mtsai 2016)

Újabban több munkacsoport is vizsgálatokat végzett a mikroRNS-ek szerepének EMT-ben betöltött szerepének feltérképezése céljából. Shukla és munkacsoportja mRNS és miRNS mennyiségének változását vizsgálat az EMT egyik jellegzetes sejtmodelleként használt MDCK sejtvonalban új generációs szekvenáló technológiával. A Ras-jelátviteli út konstans aktivációjához társulóan nagyszámú új jelátviteli molekulát és útvonalat azonosítottak, emellett a TGF- β 1 termelés növekedését is leírták. Ezen adatok alapján ezen új technológia segítségével az MDCK sejteken a TGF- β 1 autokrin hatását feltételezik. (Shukla és mtsai 2015)

Zheng és munkatársai a kolorektális eredetű tumorsejtvonalakon a miR-625-3p szerepét vizsgálták. A SCAI gén analízise során a miR-625-3p potenciális célpontjaként találtak

egy 8 nukleotidból álló génszakaszt, majd ennek élettani jelentőségét a miR-625-3p overexpresszióval is vizsgálták. A kolorektális tumorsejtvonalakon az áttétképzésre hajlamos sejtvonalakban alacsony SCAI mRNS és fehérje volt mérhető. Az áttétképzésre nem hajlamos, sok SCAI fehérjét termelő tumor sejtekben a miR-625-3p overexpresszióval amelynek során a SCAI fehérje mennyiségének csökkenése volt kimutatható. (Zheng és mtsai 2015)

A SCAI fehérje celluláris működésének pontos mechanizmusa még csak részlegesen ismert. Az eddigi adatok elsősorban a sejt plaszticitás és áttétképzés szabályozására utalnak, és ezt a hatást a SCAI elsősorban az MRTF-SRF útvonal gátlása útját fejt ki. (Brandt és mtsai 2009, Chen és mtsai 2014) Nemrégiben vált ismertté, hogy a SCAI többek között a tumorsuppresszor SWI/SNF kromatin újrendeződésért felelős fehérjekomplexre is szabályozó hatással van. (Kressner és mtsai 2013) A SCAI emellett befolyásolja az alapvetően génaktivitást csillapító hatású heterokromatin protein 1 (HP1) fehérjét, amely a CBX5 gén terméke. (Nozawa és mtsai 2010) Meglepő módon a SCAI fehérje működése kapcsolatba hozható a KDM3B nevű fehérjével is, amely H3K9me1/2 hiszton demetiláz aktivitással bír. (Brauchle és mtsai 2013) Érdekes továbbá, hogy a SCAI fehérje aminosavsorrendje az 526-523-as pozícióban PIP-box-ot is tartalmaz, ennek szekvenciája Q-x-[x]-I/L/V-x-[x]-F/Y/W/H-F/Y/W/H, és amely számos PCNA-hoz kapcsolódó fehérjében is megtalálható. A PCNA-hoz PIP-box-on keresztül kapcsolódó fehérjék feladatai közül többek között DNS többszöröződés és kromatin szerkezetváltoztatás ismert. (Mailand és mtsai 2013) A PCNA számos kromatin struktúrát szabályozó fehérjéhez kapcsolódhat, mint például a géncsillapító hatású HDAC1 fehérjéhez, vagy a WSTF-SNF2H kromatinszerkezetet szabályozó fehérjekomplexhez, illetve a már korábban említett HP1 fehérjéhez. (Murzina és mtsai 1999, Milutinovic és mtsai 2002) A felsorolt példák rámutatnak a SCAI fehérje kromatinszerkezetet befolyásoló széleskörű hatására. Ezzel együtt igazolást nyert az is, hogy a SCAI fehérje a duplaszálú DNS hibák javítására is hatással van. (Hansen és mtsai 2016) Újabb irodalmi adatok rámutatnak az emlőtumor kialakulásában fontos szerepet játszó BRCA1 és SCAI különleges kapcsolatára, mivel a SCAI fehérje és a BRCA1 fehérje mennyisége hasonlóképpen változik a duplaszálú DNS törések javításáért felelős fehérjekomplexek szabályozás során. (Isobe és mtsai 2017) Hasonló funkcionális szinergia figyelhető meg a SCAI és a BRCA1 fehérje között az EMT

folyamatában is, tekintettel arra, hogy mindkét fehérje gátolja az EMT folyamatát. (Bai és mtsai 2014)

Munkánk további részében a TGF- β 1 termelésben központi szerepet játszó AngII és AngIV hatását vizsgáltuk in vitro sejtmódelben az ECM homeosztázisában résztvevő PAI-1 fehérje promóterének aktivitására vonatkozóan. A korábban közölt vizsgálatokkal ellentétben in vitro rendszerünkben az AngIV hatására a PAI-1 promóter aktivitása csökkent. AngII hatására a proximális tubuláris epitelsejtekben a PAI-1 promóter aktivitása emelkedett, amelynek következtében az ECM degradációért felelős enzimek aktivitása csökken, és ezáltal az ECM mennyiségének növekedésével járó fibrózis progressziója látható. Eredményeink arra utalnak tehát, hogy a tubuláris epitelsejtekben PAI-1 termelés is kimutatható. Kísérleti rendszerünkben az AngII hatása alapvetően az AT₁R-on keresztül valósult meg, hasonlóképpen a vesében előforduló más sejtekhez.

A TGF- β 1 egyes in vitro rendszerekben aktiválja a PAI-1 promótert. Az AngII-TGF- β 1 kapcsolat további vizsgálata céljából a TGF- β 1 intracelluláris jelátviteli útját gátló Smad7 overexpresszióját indukáltuk. A TGF- β 1 PAI-1 promóterre kifejtett aktiváló hatását a Smad7 fehérje overexpressziója csökkentette, amely a TGF- β 1 specifikus hatására utal. Az AngII PAI-1 promóter aktivitását a Smad7 fehérje overexpressziója nem befolyásolta, amely alapján az AngII PAI-1 promóterre kifejtett hatása legnagyobb részben a TGF- β 1 jelátviteli útjaitól függetlennek igazolódott.

Az AngII intracelluláris jelátviteli útjainak további feltérképezése során a MAPK kaskád egyes szereplőit vizsgáltuk. Az ERK és JNK jelátviteli utak gátlása nem befolyásolta az AngII PAI-1 promóterre kifejtett hatását. Az AngII egy másik klasszikus jelátviteli útja a PKC enzim aktiválása, amelynek specifikus gátlószere ugyancsak nem befolyásolta a PAI-1 promóter aktivitását. Az AngII sokat vizsgált újabb jelátviteli útjai közül a receptor tirozin kinázok ugyanakkor eredményeink alapján szerepet játszhatnak az AngII PAI-1 promóter aktiváló hatásában, mivel egy nem-szelektív tirozin-kináz gátló hatására a PAI-1 promóter aktivitás csökkenése volt megfigyelhető.

Mindezek alapján felvetődik a kérdés, hogy milyen módon lehetne befolyásolni a vesefibrózis folyamatát?

Jelenleg nincs vesefibrózist általánosságban megelőző specifikus, egy támadásponton ható gyógyszer. A vesefibrózishoz vezető utakban szerepet játszó jelátviteli utak komplexitása miatt egyelőre olyan gyógyszerek használatosak a fibrózis megelőzésére, amelyek az AngII receptorainak gátlása útján hatnak.

Ugyanakkor a TGF- β 1 vesefibrózishoz vezető specifikusabb hatása miatt célszerűnek tűnhet a jelátviteli út gyógyszeres gátlása. A jelenleg klinikai kivizsgálás alatt álló gyógyszerek közül a TGF- β jelátvitelt gátlók közül van olyan, amely a tüdőfibrózis esetében használható, azonban az eddig észlelt mellékhatások miatt nem került sor széles körű elterjedésre. TGF β R gátló decorin mellett anti-TGF- β autoantitesteket is kipróbáltak klinikai vizsgálatokban. Anti-TGF- β 1 antitest használatakor prognózist lényegesen befolyásoló hatás eddigi vizsgálatok során még nem volt kimutatható, azonban érdekes módon az anti-TGF- β 2 antitest eredményesen előzte meg a glomeruloszklerózis kialakulását. A TGF- β 1 hatását több ponton is gátló pirfenidone hatását ugyancsak több tanulmányban vizsgálták. A TGF β R gátlók mellett a Smad3 és Smad4 fehérje gátlása, a Smad7 fehérje overexpressziója, a MAPK-ok aktivitásának gátlása, a cannabinoid receptor 1 gátlása, valamint a TGF β R-hoz kapcsolódó endoglin fehérje modulálása is állatkísérletes eredmények alapján terápiás célpont lehet. (Fukasawa és mtsai 2004, Ka és mtsai 2012, Meng és mtsai 2012, Lecru és mtsai 2015, Munoz-Felix és mtsai 2015)

A TGF- β 1 intracelluláris jelátviteli mechanizmusát befolyásoló BMP fehérjék közül a BMP7 fehérje terápiás hatékonyságát humán gyógyszervizsgálatokban is ellenőrizték. A BMP7 fehérje aktiválása gátolhatja az ECM termelődését a TGF- β 1 intracelluláris hatását gátlása révén. A BMP7 fehérje terápiás hatékonyság igazolására a klinikai gyógyszervizsgálatok fázis II lépésében a BMP-7 fehérjét aktiváló THR-184 fehérjét vizsgálták. A THR-187 fehérje a krónikus vesebeteggekben szívműtét során kialakuló akut vesekárosodás csökkenését eredményezte. (Lovisa és mtsai 2016).

Jelenlegi tudásunk még mindig részleges és töredezett az EMT és vesefibrózis pontos pathomechanizmusának folyamatáról. Ugyanakkor a biotechnológiai módszerekkel előállított gyógyszerek robbanásszerű térnyerése várható a jövőben, és ezen technológia még komplexebb és specifikusabb hatáspontú készítmények előállítását és használatát fogja majd lehetővé tenni, ezáltal reményeim szerint még több páciens számára válhat lehetővé a végállapotú vesebetegség megelőzése.

6 Következtetések

Vizsgálataink célkitűzésében három kérdéscsoportot foglalmaztunk meg, és a következtetéseket is ennek megfelelően foglalom össze.

1. A SCAI fehérje EMT-re kifejtett hatására vonatkozóan az alábbi következtetéseket tettük különböző állati és humán sejttípusokban és szövetekben:

a. Az LLC-PK₁/AT₁ sejtek által termelt endogén SCAI, valamint a kívülről bejuttatott gén által expresszált SCAI a sejtmagban volt elsősorban megfigyelhető, a citoplazmatikus kifejeződés nem volt számottevő. Az N-terminális végen megrövidített SCAI ugyanakkor döntő részben az LLC-PK₁/AT₁ sejtek citoplazmájában volt megfigyelhető, a sejtmagi kifejeződés nem volt számottevő.

b. LLC-PK₁/AT₁ sejtekben a SCAI fehérje overexpressziója a TGF- β 1 által indukált α -SMA promóter aktivitásra gátló hatással volt. Az N-terminális végen megrövidített SCAI jelenléte ugyanakkor nem volt gátló hatással TGF- β 1 által indukált α -SMA promóter aktivitásra.

c. LLC-PK₁/AT₁ sejtekben a SCAI fehérje overexpressziója a sejtkapcsoló struktúrák szétesése által előidézett α -SMA promóter aktivitásra gátló hatással volt. Az N-terminális végen megrövidített SCAI jelenléte ugyanakkor nem volt gátló hatással a sejtkapcsoló struktúrák szétesése által előidézett α -SMA promóter aktivitásra.

d. TGF- β 1 kezelés hatására az LLC-PK₁/AT₁ sejtek mintegy 20-22%-os arányában látható α -SMA termelődés. SCAI overexpresszió hatására TGF- β 1 kezelés hatására csökkent az α -SMA expresszió, míg N-terminális végen megrövidített SCAI jelenlétében az LLC-PK₁/AT₁ sejtekben TGF- β 1 kezelés hatására az α -SMA termelődés megőrzött volt.

e. TGF- β 1 kezelés hatására mIMCD-3 egér vese medulláris gyűjtőcsatorna sejteken a SCAI mRNS mennyisége szignifikáns csökkenést mutatott a kezeletlen sejtekhez hasonlítva.

f. TGF- β 1 transzgenikus egérmodellben a TGF- β 1 túltermelés következtében a SCAI mRNS mennyisége szignifikánsan csökkent a normál egér vese szövetéhez hasonlítva.

g. A SCAI fehérje kimutatható volt már a magzati vesében a glomerularis és tubuláris epitélsejtek sejtmagjaiban is. Születést követő, fiatal gyermekkori időszakból származó

szövetmintában ugyancsak intenzív sejtmagi SCAI mutatható ki a glomerulusban a mezangiális sejtekben, valamint podocitákban. Felnőtt vesében elsősorban a proximalis tubuláris epitelsejtekben van sejtmagi SCAI jelölődés, míg erek simaizomsejteiben mindössze kis mennyiségű SCAI expresszió volt jelen. Az erekben az endotélsejtekben SCAI fehérje jelölődés ugyancsak kimutatható volt.

h. Daganatmentes fibrotikus vese intersticiumban SCAI nem volt kimutatható, míg a megmaradt tubuláris sejtekben kis mennyiségű, döntő részben sejtmagi elhelyezkedésű SCAI volt kimutatható. Szklerotikus glomerulusokban SCAI jelölődés nem volt kimutatható.

2. A SCAI fehérje humán rosszindulatú daganatos szövetekben kimutathatóságáról és a daganatok kialakulásában betöltött szerepéről az alábbi következtetések tehetők:

- a. A felnőttkori világossejtes veserákban SCAI expresszió nem volt kimutatható, ugyanakkor a gyermekkori Wilms tumorban sejtmagi SCAI jelölődés volt látható.
- b. Génexpressziós adatbázis adatai alapján vizsgálva típusos in situ duktális és invazív emlőrákban a SCAI mRNS expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt az egészséges emlőszövethez hasonlítva.
- c. Génexpressziós adatbázisban vizsgálva T1-T4 stádiumú rosszindulatú vastagbél szövetből származó SCAI mRNS mennyisége szignifikánsan emelkedett volt a normál vastagbél szövethez hasonlítva.
- d. Génexpressziós adatbázis adatai alapján a SCAI mRNS expresszió nem különbözött szignifikáns értékben vastagbél elsődleges rosszindulatú daganat és a rosszindulatú daganat áttéte között.
- e. A SCAI fehérje kimutatható volt vastagbél rosszindulatú daganat sejtekben, elsősorban a sejtmagban volt kimutatható nagyobb mennyiségű SCAI fehérje a daganatmentes vastagbél szövethez hasonlítva.

3. A PAI-1 fehérje ECM homeosztázisban betöltött szerepéről az alábbi következtetéseket állapítottuk meg:

- a. LLC-PK₁/AT₁ sejtekben az AngIV nem idézett elő PAI-1 promóter aktivitás emelkedést.

- b. Az AngII LLC-PK₁/AT₁ sejtekben a PAI-1 promóter aktivitást dóziszfüggő módon növelte, és ezen promóteraktiváló hatás AT₁R-on keresztül valósult meg.
- c. TGF- β 1 intracelluláris jelátvitelében gátló hatású Smad7 fehérje overexpressziója nem csökkentette LLC-PK₁/AT₁ sejtekben az AngII által kiváltott PAI-1 promóteraktivitás növekedés mértékét, mindezek alapján az AngII hatása elsősorban nem a Smad jelátviteli úton keresztül zajlik.
- d. LLC-PK₁/AT₁ sejtekben a MEK, JNK kinázok aktivitásának gátlása nem volt hatással a PAI-1 promóter AngII által előidézett aktivitás növekedésre.
- e. LLC-PK₁/AT₁ sejtekben az AngII által előidézett PAI-1 promóter aktivitás növekedésben részt vesznek tirozin kinázok, azonban ezen folyamatban nem vesz részt a PKC.

7 Összefoglalás

A népbetegségnek tekinthető végállapotú veseelégtelenség hátterében a vesefibrózis áll, amelynek kialakulásában jelenleg progresszív folyamatok ismertek, ugyanakkor az újabb adatok arra utalnak, hogy ezen progresszív folyamat a korábban gondoltakhoz képest dinamikusabb, és akár reverzibilis lépések részét képezhetik. A vesefibrózis kialakulásához vezető egyik kulcsfolyamat az epiteliális-mezenchymális tranzíció (EMT), amelynek szabályozó folyamatai jelenleg csak részben ismertek.

Munkánk során olyan intracelluláris fehérje szerepét vizsgáltuk, amely a vesefibrózis folyamatában kulcsszerepet játszó hormonok (AngII és TGF- β 1) által előidézett EMT folyamatának intracelluláris jelátviteli mechanizmusának szabályozásában volt feltételezhető.

Igazoltuk, hogy a SCAI fehérje a vese számos sejtjében kimutatható, fiatal életkorban nagyobb mennyiségben, idős vesében kisebb mennyiségben. A SCAI fehérje kulcsszerepet játszik a TGF- β 1 által előidézett EMT az α -SMA expresszió szabályozásában. A SCAI fehérje emellett kimutatható volt a vese fiataalkori malignus daganatában (Wilms-tumor), ugyanakkor idősebb veséből kiinduló tumorban kisebb mennyiségben volt jelen. Megfigyeltük továbbá, hogy colon tumorokban a SCAI expresszió mennyisége jelentősen megnövekedett.

A vesefibrózis során termelődő extracelluláris mátrix (ECM) homeosztázisáért felelős PAI-1 gén működésének vizsgálata során kimutattuk, hogy az AngII kulcsszerepet játszik az PAI-1 gén aktivitásának növekedésében, ugyanakkor a degradációs termék AngIV nem volt hatással a PAI-1 gén aktivitásra. Ezen AngII által elindított jelátviteli folyamatok során igazoltuk a tirozin kinázok részvételét, ugyanakkor sem a TGF- β 1 intracelluláris jelátvitelében szerepet játszó gátló Smad7 fehérje, sem a JNK és MEK kinázok nem játszanak szerepet az AngII PAI-1 fehérjét indukáló intracelluláris jelátviteli folyamatában, és nincs hatással a PKC sem ezen jelátviteli utakra.

Munkánk során az AngII-TGF- β 1 rendszer komplex jelátviteli mechanizmusait vizsgáltuk, és ezen folyamatok lehetőséget adtak egyes vesefibrózist lassító terápiás célpontok azonosítására.

8 Summary

Renal fibrosis leads to end-stage renal failure, considered to be a relatively frequent disease. The development of renal fibrosis is a process, characterized by dynamic and partly reversible mechanisms. One key process leading to the development of renal fibrosis is epithelial-mesenchymal transition (EMT), which is a highly complex form of cellular plasticity. Regulation of EMT is still highly investigated in order to decipher novel mechanisms leading to diseased cellular phenotypes.

We studied the role of certain proteins considered to control the intercellular signaling mechanisms leading to EMT in the context of AngII and TGF- β 1 induced renal fibrosis. We have shown that SCAI protein can be detected in several kidney cells at younger ages, and in smaller quantities in elderly kidneys. SCAI protein plays a key role in TGF- β 1-induced α -SMA expression in cellular models of EMT. SCAI protein was also detected in younger malignant tumors of the kidney (Wilms' tumor), and reduced SCAI protein was detected in malignant tumors developed in older kidney. We have observed a massive SCAI overexpression in colon tumours.

When investigating the function of PAI-1, a gene responsible for the homeostasis of the extracellular matrix (ECM) produced during the renal fibrosis, we have shown that AngII plays a key role in enhancing the activity of the PAI-1 gene. Intriguingly, the degradation product AngIV has no effect on PAI-1 gene activity. We have confirmed the participation of tyrosine kinases in the signaling processes initiated by AngII,. Further, inhibition of Smad7, JNK, MEK or PKC had no effect on AngII induced PAI-1 promoter activity.

Our work shed some light onto the complex signaling mechanisms of the AngII-TGF- β 1 system. It is very important to further study these processes as novel discoveries could give the opportunity to identify some novel therapeutic targets that could slow down the progression of renal fibrosis.

9 Irodalomjegyzék

1. Andreka, P., J. Zang, C. Dougherty, T. I. Slepak, K. A. Webster és N. H. Bishopric (2001). Cytoprotection by Jun kinase during nitric oxide-induced cardiac myocyte apoptosis. *Circ Res* 88: 305-312.
2. Arora, P. D. és C. A. McCulloch (1994). Dependence of collagen remodelling on alpha-smooth muscle actin expression by fibroblasts. *J Cell Physiol* 159: 161-175.
3. Asada, N., M. Takase, J. Nakamura, A. Oguchi, M. Asada, N. Suzuki, K. Yamamura, N. Nagoshi, S. Shibata, T. N. Rao, H. J. Fehling, A. Fukatsu, N. Minegishi, T. Kita, T. Kimura, H. Okano, M. Yamamoto és M. Yanagita (2011). Dysfunction of fibroblasts of extrarenal origin underlies renal fibrosis and renal anemia in mice. *J Clin Invest* 121: 3981-3990.
4. Asparuhova, M. B., J. Ferralli, M. Chiquet és R. Chiquet-Ehrismann (2011). The transcriptional regulator megakaryoblastic leukemia-1 mediates serum response factor-independent activation of tenascin-C transcription by mechanical stress. *FASEB J* 25: 3477-3488.
5. Bai, F., H. L. Chan, A. Scott, M. D. Smith, C. Fan, J. I. Herschkowitz, C. M. Perou, A. S. Livingstone, D. J. Robbins, A. J. Capobianco és X. H. Pei (2014). BRCA1 suppresses epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell dedifferentiation during mammary and tumor development. *Cancer Res* 74: 6161-6172.
6. Ballhause, T. M., R. Soldati és P. R. Mertens (2014). Sources of myofibroblasts in kidney fibrosis: all answers are correct, however to different extent! *Int Urol Nephrol* 46: 659-664.
7. Bolignano, D., F. Mattace-Raso, E. J. Sijbrands és C. Zoccali (2014). The aging kidney revisited: A systematic review. *Ageing Res Rev*.
8. Boor, P., T. Ostendorf és J. Floege (2010). Renal fibrosis: novel insights into mechanisms and therapeutic targets. *Nat Rev Nephrol* 6: 643-656.
9. Borges, F. T., S. A. Melo, B. C. Ozdemir, N. Kato, I. Revuelta, C. A. Miller, V. H. Gattone, 2nd, V. S. LeBleu és R. Kalluri (2013). TGF-beta1-containing exosomes from injured epithelial cells activate fibroblasts to initiate tissue regenerative responses and fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 24: 385-392.

10. Brandt, D. T., C. Baarlink, T. M. Kitzing, E. Kremmer, J. Ivaska, P. Nollau és R. Grosse (2009). SCAI acts as a suppressor of cancer cell invasion through the transcriptional control of beta1-integrin. *Nat Cell Biol* 11: 557-568.
11. Brandt, D. T., J. Xu, H. Steinbeisser és R. Grosse (2009). Regulation of myocardin-related transcriptional coactivators through cofactor interactions in differentiation and cancer. *Cell Cycle* 8: 2523-2527.
12. Branton, M. H. és J. B. Kopp (1999). TGF-beta and fibrosis. *Microbes Infect* 1: 1349-1365.
13. Brauchle, M., Z. Yao, R. Arora, S. Thigale, I. Clay, B. Inverardi, J. Fletcher, P. Taslimi, M. G. Acker, B. Gerrits, J. Voshol, A. Bauer, D. Schubeler, T. Bouwmeester és H. Ruffner (2013). Protein complex interactor analysis and differential activity of KDM3 subfamily members towards H3K9 methylation. *PLoS One* 8: e60549.
14. Burns, K. D. és R. C. Harris (1995). Signaling and growth responses of LLC-PK1/C14 cells transfected with the rabbit AT1 ANG II receptor. *Am J Physiol* 268: C925-935.
15. Busche, S., A. Descot, S. Julien, H. Genth és G. Posern (2008). Epithelial cell-cell contacts regulate SRF-mediated transcription via Rac-actin-MAL signalling. *J Cell Sci* 121: 1025-1035.
16. Campanholle, G., G. Ligresti, S. A. Gharib és J. S. Duffield (2013). Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 3. Novel mechanisms of kidney fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 304: C591-603.
17. Cao, M. X., Y. P. Jiang, Y. L. Tang és X. H. Liang (2017). The crosstalk between lncRNA and microRNA in cancer metastasis: orchestrating the epithelial-mesenchymal plasticity. *Oncotarget* 8: 12472-12483.
18. Carvajal, G., J. Rodriguez-Vita, R. Rodrigues-Diez, E. Sanchez-Lopez, M. Ruperez, C. Cartier, V. Esteban, A. Ortiz, J. Egido, S. A. Mezzano és M. Ruiz-Ortega (2008). Angiotensin II activates the Smad pathway during epithelial mesenchymal transdifferentiation. *Kidney Int* 74: 585-595.
19. Catania, J. M., G. Chen és A. R. Parrish (2007). Role of matrix metalloproteinases in renal pathophysiology. *Am J Physiol Renal Physiol* 292: F905-911.

20. Chadban, S. J., E. M. Briganti, P. G. Kerr, D. W. Dunstan, T. A. Welborn, P. Z. Zimmet és R. C. Atkins (2003). Prevalence of kidney damage in Australian adults: The AusDiab kidney study. *J Am Soc Nephrol* 14: S131-138.
21. Chai, S. Y., R. Fernando, G. Peck, S. Y. Ye, F. A. Mendelsohn, T. A. Jenkins és A. L. Albiston (2004). The angiotensin IV/AT4 receptor. *Cell Mol Life Sci* 61: 2728-2737.
22. Chang, E. és H. Goldberg (1995). Requirements for transforming growth factor-beta regulation of the pro-alpha 2(I) collagen and plasminogen activator inhibitor-1 promoters. *J Biol Chem* 270: 4473-4477.
23. Chen, X., W. Hu, B. Xie, H. Gao, C. Xu és J. Chen (2014). Downregulation of SCAI enhances glioma cell invasion and stem cell like phenotype by activating Wnt/beta-catenin signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 448: 206-211.
24. Connolly, E. C., J. Freimuth és R. J. Akhurst (2012). Complexities of TGF-beta targeted cancer therapy. *Int J Biol Sci* 8: 964-978.
25. Coresh, J., E. Selvin, L. A. Stevens, J. Manzi, J. W. Kusek, P. Eggers, F. Van Lente és A. S. Levey (2007). Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *JAMA* 298: 2038-2047.
26. Crider, B. J., G. M. Risinger, Jr., C. J. Haaksma, E. W. Howard és J. J. Tomasek (2011). Myocardin-related transcription factors A and B are key regulators of TGF-beta1-induced fibroblast to myofibroblast differentiation. *J Invest Dermatol* 131: 2378-2385.
27. De Chiara, L. és J. Crean (2016). Emerging Transcriptional Mechanisms in the Regulation of Epithelial to Mesenchymal Transition and Cellular Plasticity in the Kidney. *J Clin Med* 5.
28. Derynck, R., B. P. Muthusamy és K. Y. Saetern (2014). Signaling pathway cooperation in TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition. *Curr Opin Cell Biol* 31: 56-66.
29. Duffield, J. S., S. J. Forbes, C. M. Constandinou, S. Clay, M. Partolina, S. Vuthoori, S. Wu, R. Lang és J. P. Iredale (2005). Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest* 115: 56-65.
30. Eddy, A. A. (2002). Plasminogen activator inhibitor-1 and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 283: F209-220.

31. Eddy, A. A. (2005). Progression in chronic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis* 12: 353-365.
32. Eddy, A. A. (2009). Serine proteases, inhibitors and receptors in renal fibrosis. *Thromb Haemost* 101: 656-664.
33. Eddy, A. A. (2013). The origin of scar-forming kidney myofibroblasts. *Nat Med* 19: 964-966.
34. Eddy, A. A. (2014). Overview of the cellular and molecular basis of kidney fibrosis. *Kidney Int Suppl* 4: 2-8.
35. Eddy, A. A. és A. B. Fogo (2006). Plasminogen activator inhibitor-1 in chronic kidney disease: evidence and mechanisms of action. *J Am Soc Nephrol* 17: 2999-3012.
36. Elberg, G., L. Chen, D. Elberg, M. D. Chan, C. J. Logan és M. A. Turman (2008). MKL1 mediates TGF-beta1-induced alpha-smooth muscle actin expression in human renal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 294: F1116-1128.
37. Fan, L., A. Sebe, Z. Peterfi, A. Masszi, A. C. Thirone, O. D. Rotstein, H. Nakano, C. A. McCulloch, K. Szaszi, I. Mucsi és A. Kapus (2007). Cell contact-dependent regulation of epithelial-myofibroblast transition via the rho-rho kinase-phosphomyosin pathway. *Mol Biol Cell* 18: 1083-1097.
38. Farris, A. B., C. D. Adams, N. Brousaides, P. A. Della Pelle, A. B. Collins, E. Moradi, R. N. Smith, P. C. Grimm és R. B. Colvin (2011). Morphometric and visual evaluation of fibrosis in renal biopsies. *J Am Soc Nephrol* 22: 176-186.
39. Farris, A. B. és R. B. Colvin (2012). Renal interstitial fibrosis: mechanisms and evaluation. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 21: 289-300.
40. Feng, X. H. és R. Derynck (2005). Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 659-693.
41. Fujigaki, Y., Y. Muranaka, D. Sun, T. Goto, H. Zhou, M. Sakakima, H. Fukasawa, K. Yonemura, T. Yamamoto és A. Hishida (2005). Transient myofibroblast differentiation of interstitial fibroblastic cells relevant to tubular dilatation in uranyl acetate-induced acute renal failure in rats. *Virchows Arch* 446: 164-176.
42. Fukasawa, H., T. Yamamoto, H. Suzuki, A. Togawa, N. Ohashi, Y. Fujigaki, C. Uchida, M. Aoki, M. Hosono, M. Kitagawa és A. Hishida (2004). Treatment with

- anti-TGF-beta antibody ameliorates chronic progressive nephritis by inhibiting Smad/TGF-beta signaling. *Kidney Int* 65: 63-74.
43. Gabbiani, G. és G. Majno (1972). Dupuytren's contracture: fibroblast contraction? An ultrastructural study. *Am J Pathol* 66: 131-146.
 44. Garat, C., V. Van Putten, Z. A. Refaat, C. Dessev, S. Y. Han és R. A. Nemenoff (2000). Induction of smooth muscle alpha-actin in vascular smooth muscle cells by arginine vasopressin is mediated by c-Jun amino-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 275: 22537-22543.
 45. Genovese, F., A. A. Manresa, D. J. Leeming, M. A. Karsdal és P. Boor (2014). The extracellular matrix in the kidney: a source of novel non-invasive biomarkers of kidney fibrosis? *Fibrogenesis Tissue Repair* 7: 4.
 46. Gesualdo, L., E. Ranieri, R. Monno, M. R. Rossiello, M. Colucci, N. Semeraro, G. Grandaliano, F. P. Schena, M. Ursi és G. Cerullo (1999). Angiotensin IV stimulates plasminogen activator inhibitor-1 expression in proximal tubular epithelial cells. *Kidney Int* 56: 461-470.
 47. Ghosh, A. K., S. B. Murphy, R. Kishore és D. E. Vaughan (2013). Global gene expression profiling in PAI-1 knockout murine heart and kidney: molecular basis of cardiac-selective fibrosis. *PLoS One* 8: e63825.
 48. Ghosh, A. K. és D. E. Vaughan (2012). PAI-1 in tissue fibrosis. *J Cell Physiol* 227: 493-507.
 49. Goldberg, H., T. Helaakoski, L. A. Garrett, G. Karsenty, A. Pellegrino, G. Lozano, S. Maity és B. de Crombrughe (1992). Tissue-specific expression of the mouse alpha 2(I) collagen promoter. Studies in transgenic mice and in tissue culture cells. *J Biol Chem* 267: 19622-19630.
 50. Grande, M. T. és J. M. Lopez-Novoa (2009). Fibroblast activation and myofibroblast generation in obstructive nephropathy. *Nat Rev Nephrol* 5: 319-328.
 51. Grande, M. T., B. Sanchez-Laorden, C. Lopez-Blau, C. A. De Frutos, A. Boutet, M. Arevalo, R. G. Rowe, S. J. Weiss, J. M. Lopez-Novoa és M. A. Nieto (2015). Snail1-induced partial epithelial-to-mesenchymal transition drives renal fibrosis in mice and can be targeted to reverse established disease. *Nat Med* 21: 989-997.
 52. Grgic, I., J. S. Duffield és B. D. Humphreys (2012). The origin of interstitial myofibroblasts in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 27: 183-193.

53. Hallan, S. I., J. Coresh, B. C. Astor, A. Asberg, N. R. Powe, S. Romundstad, H. A. Hallan, S. Lydersen és J. Holmen (2006). International comparison of the relationship of chronic kidney disease prevalence and ESRD risk. *J Am Soc Nephrol* 17: 2275-2284.
54. Hansen, R. K., A. Mund, S. L. Poulsen, M. Sandoval, K. Klement, K. Tsouroula, M. A. Tollenaere, M. Raschle, R. Soria, S. Offermanns, T. Worzfeld, R. Grosse, D. T. Brandt, B. Rozell, M. Mann, F. Cole, E. Soutoglou, A. A. Goodarzi, J. A. Daniel, N. Mailand és S. Bekker-Jensen (2016). SCAI promotes DNA double-strand break repair in distinct chromosomal contexts. *Nat Cell Biol* 18: 1357-1366.
55. Hautmann, M. B., C. S. Madsen és G. K. Owens (1997). A transforming growth factor beta (TGFbeta) control element drives TGFbeta-induced stimulation of smooth muscle alpha-actin gene expression in concert with two CArG elements. *J Biol Chem* 272: 10948-10956.
56. He, J., Y. Xu, D. Koya és K. Kanasaki (2013). Role of the endothelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis of chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol* 17: 488-497.
57. Hijova, E. (2005). Matrix metalloproteinases: their biological functions and clinical implications. *Bratisl Lek Listy* 106: 127-132.
58. Hill, C. S. (2009). Nucleocytoplasmic shuttling of Smad proteins. *Cell Res* 19: 36-46.
59. Hinson, J. S., M. D. Medlin, K. Lockman, J. M. Taylor és C. P. Mack (2007). Smooth muscle cell-specific transcription is regulated by nuclear localization of the myocardin-related transcription factors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H1170-1180.
60. Hirsch, F. R., M. Varella-Garcia, P. A. Bunn, Jr., M. V. Di Maria, R. Veve, R. M. Bremmes, A. E. Baron, C. Zeng és W. A. Franklin (2003). Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol* 21: 3798-3807.
61. Hu, B., Z. Wu és S. H. Phan (2003). Smad3 mediates transforming growth factor-beta-induced alpha-smooth muscle actin expression. *Am J Respir Cell Mol Biol* 29: 397-404.

62. Huang, X. R., A. C. Chung, X. J. Wang, K. N. Lai és H. Y. Lan (2008). Mice overexpressing latent TGF-beta1 are protected against renal fibrosis in obstructive kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 295: F118-127.
63. Huang, X. R., A. C. Chung, L. Zhou, X. J. Wang és H. Y. Lan (2008). Latent TGF-beta1 protects against crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 19: 233-242.
64. Huang, Y., W. A. Border, D. A. Lawrence és N. A. Noble (2009). Mechanisms underlying the antifibrotic properties of noninhibitory PAI-1 (PAI-1R) in experimental nephritis. *Am J Physiol Renal Physiol* 297: F1045-1054.
65. Huang, Y., W. A. Border, L. Yu, J. Zhang, D. A. Lawrence és N. A. Noble (2008). A PAI-1 mutant, PAI-1R, slows progression of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 19: 329-338.
66. Huang, Y., M. Haraguchi, D. A. Lawrence, W. A. Border, L. Yu és N. A. Noble (2003). A mutant, noninhibitory plasminogen activator inhibitor type 1 decreases matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *J Clin Invest* 112: 379-388.
67. Humphreys, B. D., S. L. Lin, A. Kobayashi, T. E. Hudson, B. T. Nowlin, J. V. Bonventre, M. T. Valerius, A. P. McMahon és J. S. Duffield (2010). Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Am J Pathol* 176: 85-97.
68. Hunyady, L. és K. J. Catt (2006). Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Mol Endocrinol* 20: 953-970.
69. Huszár, T., I. Mucsi, B. Antus, T. Terebessy, C. Jeney, A. Masszi, L. Hunyady, B. Mihalik, H. J. Goldberg, T. J. Thekkumkara és L. Rosivall (2001). Extracellular signal-regulated kinase and the small GTP-binding protein p21Rac1 are involved in the regulation of gene transcription by angiotensin II. *Exp Nephrol* 9: 142-149.
70. Inoue, T., A. Umezawa, T. Takenaka, H. Suzuki és H. Okada (2014). The contribution of epithelial-mesenchymal transition to renal fibrosis differs among kidney disease models. *Kidney Int*.
71. Ishikawa, M., N. Nishijima, J. Shiota, H. Sakagami, K. Tsuchida, M. Mizukoshi, M. Fukuchi, M. Tsuda és A. Tabuchi (2010). Involvement of the serum response factor coactivator megakaryoblastic leukemia (MKL) in the activin-regulated dendritic complexity of rat cortical neurons. *J Biol Chem* 285: 32734-32743.

72. Isobe, S. Y., K. Nagao, N. Nozaki, H. Kimura és C. Obuse (2017). Inhibition of RIF1 by SCAI Allows BRCA1-Mediated Repair. *Cell Rep* 20: 297-307.
73. Iwano, M., D. Plieth, T. M. Danoff, C. Xue, H. Okada és E. G. Neilson (2002). Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest* 110: 341-350.
74. Jayaraman, L. és J. Massague (2000). Distinct oligomeric states of SMAD proteins in the transforming growth factor-beta pathway. *J Biol Chem* 275: 40710-40717.
75. Johnson, L. A., E. S. Rodansky, A. J. Haak, S. D. Larsen, R. R. Neubig és P. D. Higgins (2014). Novel Rho/MRTF/SRF inhibitors block matrix-stiffness and TGF-beta-induced fibrogenesis in human colonic myofibroblasts. *Inflamm Bowel Dis* 20: 154-165.
76. Johnson, N. L., A. M. Gardner, K. M. Diener, C. A. Lange-Carter, J. Gleavy, M. B. Jarpe, A. Minden, M. Karin, L. I. Zon és G. L. Johnson (1996). Signal transduction pathways regulated by mitogen-activated/extracellular response kinase kinase induce cell death. *J Biol Chem* 271: 3229-3237.
77. Ka, S. M., Y. C. Yeh, X. R. Huang, T. K. Chao, Y. J. Hung, C. P. Yu, T. J. Lin, C. C. Wu, H. Y. Lan és A. Chen (2012). Kidney-targeting Smad7 gene transfer inhibits renal TGF-beta/MAD homologue (SMAD) and nuclear factor kappaB (NF-kappaB) signalling pathways, and improves diabetic nephropathy in mice. *Diabetologia* 55: 509-519.
78. Kagami, S., W. A. Border, D. E. Miller és N. A. Noble (1994). Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor-beta expression in rat glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 93: 2431-2437.
79. Kaissling, B. és M. Le Hir (2008). The renal cortical interstitium: morphological and functional aspects. *Histochem Cell Biol* 130: 247-262.
80. Kaissling, B., M. Lehir és W. Kriz (2013). Renal epithelial injury and fibrosis. *Biochim Biophys Acta* 1832: 931-939.
81. Kamar, N., C. Maaroufi, C. Guilbeau-Frugier, A. Servais, V. Meas-Yedid, I. Tack, E. Thervet, O. Cointault, L. Esposito, J. Guitard, L. Lavayssiere, C. Panterne, F. Muscari, C. Bureau és L. Rostaing (2012). Do kidney histology lesions predict long-term kidney function after liver transplantation? *Clin Transplant* 26: 927-934.

82. Kardassis, D., C. Murphy, T. Fotsis, A. Moustakas és C. Stournaras (2009). Control of transforming growth factor beta signal transduction by small GTPases. *FEBS J* 276: 2947-2965.
83. Keeton, M. R., S. A. Curriden, A. J. van Zonneveld és D. J. Loskutoff (1991). Identification of regulatory sequences in the type 1 plasminogen activator inhibitor gene responsive to transforming growth factor beta. *J Biol Chem* 266: 23048-23052.
84. Kerins, D. M., Q. Hao és D. E. Vaughan (1995). Angiotensin induction of PAI-1 expression in endothelial cells is mediated by the hexapeptide angiotensin IV. *J Clin Invest* 96: 2515-2520.
85. Kiss, I., Z. Kiss, C. Ambrus, A. Szabo, J. Szegedi, J. Balla, E. Ladanyi, B. Csiky, O. Arkossy, M. Torok, S. Turi, I. Kulcsar és C.-M. W. G. o. H. S. o. Nephrology (2013). Age-dependent parathormone levels and different CKD-MBD treatment practices of dialysis patients in Hungary--results from a nationwide clinical audit. *BMC Nephrol* 14: 155.
86. Kramann, R., D. P. DiRocco és B. D. Humphreys (2013). Understanding the origin, activation and regulation of matrix-producing myofibroblasts for treatment of fibrotic disease. *J Pathol* 231: 273-289.
87. Kressner, C., P. Nollau, R. Grosse és D. T. Brandt (2013). Functional interaction of SCAI with the SWI/SNF complex for transcription and tumor cell invasion. *PLoS One* 8: e69947.
88. Kretzschmar, M., J. Doody, I. Timokhina és J. Massague (1999). A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev* 13: 804-816.
89. Kulcsár, I., Illés, M, Kovács, L (2015). Dialíziskezelés Magyarországon: 2010-2015. *Hypertonia és Nephrologia* 20: 208-212.
90. Kulcsár, I., Szegedi, J, Ladányi, E, Török, M, Túri, S, Kiss, I (2010). Dialíziskezelés Magyarországon: 2003-2009. *Hypertonia és Nephrologia* 14: 247-253.
91. Langer R, T. E. (2010). A vesetranszplantáció helyzete Magyarországon, 2010. *Hypertonia és Nephrologia* 14: 243-246.
92. Le Hir, M., I. Hegyi, D. Cueni-Löffing, J. Löffing és B. Kaissling (2005). Characterization of renal interstitial fibroblast-specific protein 1/S100A4-positive cells in healthy and inflamed rodent kidneys. *Histochem Cell Biol* 123: 335-346.

93. LeBleu, V. S., G. Taduri, J. O'Connell, Y. Teng, V. G. Cooke, C. Woda, H. Sugimoto és R. Kalluri (2013). Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Nat Med* 19: 1047-1053.
94. Lecru, L., C. Desterke, S. Grassin-Delyle, C. Chatziantoniou, S. Vandermeersch, A. Devocelle, A. Vernochet, N. Ivanovski, C. Ledent, S. Ferlicot, M. Dalia, M. Said, S. Beaudreuil, B. Charpentier, A. Vazquez, J. Giron-Michel, B. Azzarone, A. Durrbach és H. Francois (2015). Cannabinoid receptor 1 is a major mediator of renal fibrosis. *Kidney Int* 88: 72-84.
95. Lee, A. L., K. H. Huh, S. H. Lee, J. J. Lee, D. J. Joo, H. J. Jeong, M. S. Kim, S. I. Kim és Y. S. Kim (2016). Significance of Time-Zero Biopsy for Graft Renal Function After Deceased Donor Kidney Transplantation. *Transplant Proc* 48: 2656-2662.
96. Li, J., N. Bowens, L. Cheng, X. Zhu, M. Chen, S. Hannenhalli, T. P. Cappola és M. S. Parmacek (2012). Myocardin-like protein 2 regulates TGFbeta signaling in embryonic stem cells and the developing vasculature. *Development* 139: 3531-3542.
97. Li, J., X. Zhu, M. Chen, L. Cheng, D. Zhou, M. M. Lu, K. Du, J. A. Epstein és M. S. Parmacek (2005). Myocardin-related transcription factor B is required in cardiac neural crest for smooth muscle differentiation and cardiovascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 8916-8921.
98. Li, Q., L. Zhang, M. Pfaffendorf és P. A. van Zwieten (1995). Comparative effects of angiotensin II and its degradation products angiotensin III and angiotensin IV in rat aorta. *Br J Pharmacol* 116: 2963-2970.
99. Lin, S. L., T. Kisseleva, D. A. Brenner és J. S. Duffield (2008). Pericytes and perivascular fibroblasts are the primary source of collagen-producing cells in obstructive fibrosis of the kidney. *Am J Pathol* 173: 1617-1627.
100. Lobry, C., P. Oh és I. Aifantis (2011). Oncogenic and tumor suppressor functions of Notch in cancer: it's NOTCH what you think. *J Exp Med* 208: 1931-1935.
101. Loeffler, I. és G. Wolf (2014). Transforming growth factor-beta and the progression of renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 29 Suppl 1: i37-i45.
102. Loeffler, I. és G. Wolf (2015). Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Diabetic Nephropathy: Fact or Fiction? *Cells* 4: 631-652.

103. Lopez-Hernandez, F. J. és J. M. Lopez-Novoa (2012). Role of TGF-beta in chronic kidney disease: an integration of tubular, glomerular and vascular effects. *Cell Tissue Res* 347: 141-154.
104. Lovisa, S., V. S. LeBleu, B. Tampe, H. Sugimoto, K. Vадnagara, J. L. Carstens, C. C. Wu, Y. Hagos, B. C. Burckhardt, T. Pentcheva-Hoang, H. Nischal, J. P. Allison, M. Zeisberg és R. Kalluri (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis. *Nat Med* 21: 998-1009.
105. Lovisa, S., M. Zeisberg és R. Kalluri (2016). Partial Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Other New Mechanisms of Kidney Fibrosis. *Trends Endocrinol Metab* 27: 681-695.
106. Lyons, R. M., L. E. Gentry, A. F. Purchio és H. L. Moses (1990). Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor beta 1 by plasmin. *J Cell Biol* 110: 1361-1367.
107. Mack, C. P. és G. K. Owens (1999). Regulation of smooth muscle alpha-actin expression in vivo is dependent on CArG elements within the 5' and first intron promoter regions. *Circ Res* 84: 852-861.
108. Mack, C. P., M. M. Thompson, S. Lawrenz-Smith és G. K. Owens (2000). Smooth muscle alpha-actin CArG elements coordinate formation of a smooth muscle cell-selective, serum response factor-containing activation complex. *Circ Res* 86: 221-232.
109. Mack, M. és M. Yanagita (2014). Origin of myofibroblasts and cellular events triggering fibrosis. *Kidney Int*.
110. Mailand, N., I. Gibbs-Seymour és S. Bekker-Jensen (2013). Regulation of PCNA-protein interactions for genome stability. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14: 269-282.
111. Mandache, E., M. Gherghiceanu, C. Serafinceanu, M. Penescu és G. Mircescu (2011). Myofibroblast involvement in tubular basement membrane remodeling in type II diabetic nephropathy. *Rom J Morphol Embryol* 52: 75-79.
112. Massague, J. (2012). TGFbeta signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 616-630.
113. Masszi, A., C. Di Ciano, G. Sirokmany, W. T. Arthur, O. D. Rotstein, J. Wang, C. A. McCulloch, L. Rosivall, I. Mucsi és A. Kapus (2003). Central role for Rho in

- TGF-beta1-induced alpha-smooth muscle actin expression during epithelial-mesenchymal transition. *Am J Physiol Renal Physiol* 284: F911-924.
114. Matsuo, S., J. M. Lopez-Guisa, X. Cai, D. M. Okamura, C. E. Alpers, R. E. Bumgarner, M. A. Peters, G. Zhang és A. A. Eddy (2005). Multifunctionality of PAI-1 in fibrogenesis: evidence from obstructive nephropathy in PAI-1-overexpressing mice. *Kidney Int* 67: 2221-2238.
 115. Medjkane, S., C. Perez-Sanchez, C. Gaggioli, E. Sahai és R. Treisman (2009). Myocardin-related transcription factors and SRF are required for cytoskeletal dynamics and experimental metastasis. *Nat Cell Biol* 11: 257-268.
 116. Meng, X. M., A. C. Chung és H. Y. Lan (2013). Role of the TGF-beta/BMP-7/Smad pathways in renal diseases. *Clin Sci (Lond)* 124: 243-254.
 117. Meng, X. M., X. R. Huang, J. Xiao, A. C. Chung, W. Qin, H. Y. Chen és H. Y. Lan (2012). Disruption of Smad4 impairs TGF-beta/Smad3 and Smad7 transcriptional regulation during renal inflammation and fibrosis in vivo and in vitro. *Kidney Int* 81: 266-279.
 118. Meng, X. M., D. J. Nikolic-Paterson és H. Y. Lan (2016). TGF-beta: the master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol* 12: 325-338.
 119. Mengel, M., B. Sis, M. Haas, R. B. Colvin, P. F. Halloran, L. C. Racusen, K. Solez, L. Cendales, A. J. Demetris, C. B. Drachenberg, C. F. Farver, E. R. Rodriguez, W. D. Wallace, D. Glotz és c. Banff meeting report writing (2012). Banff 2011 Meeting report: new concepts in antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* 12: 563-570.
 120. Meran, S. és R. Steadman (2011). Fibroblasts and myofibroblasts in renal fibrosis. *Int J Exp Pathol* 92: 158-167.
 121. Milutinovic, S., Q. Zhuang és M. Szyf (2002). Proliferating cell nuclear antigen associates with histone deacetylase activity, integrating DNA replication and chromatin modification. *J Biol Chem* 277: 20974-20978.
 122. Moeller, I., E. F. Clune, P. A. Fennessy, J. A. Bingley, A. L. Albiston, F. A. Mendelsohn és S. Y. Chai (1999). Up regulation of AT4 receptor levels in carotid arteries following balloon injury. *Regul Pept* 83: 25-30.
 123. Mokalled, M. H., A. Johnson, Y. Kim, J. Oh és E. N. Olson (2010). Myocardin-related transcription factors regulate the Cdk5/Pctaire1 kinase cascade to control

- neurite outgrowth, neuronal migration and brain development. *Development* 137: 2365-2374.
124. Motojima, M., T. Ando és T. Yoshioka (2000). Sp1-like activity mediates angiotensin-II-induced plasminogen-activator inhibitor type-1 (PAI-1) gene expression in mesangial cells. *Biochem J* 349: 435-441.
 125. Moustakas, A. és C. H. Heldin (2009). The regulation of TGFbeta signal transduction. *Development* 136: 3699-3714.
 126. Mu, Y., S. K. Gudey és M. Landstrom (2012). Non-Smad signaling pathways. *Cell Tissue Res* 347: 11-20.
 127. Mucsi, I., K. L. Skorecki és H. J. Goldberg (1996). Extracellular signal-regulated kinase and the small GTP-binding protein, Rac, contribute to the effects of transforming growth factor-beta1 on gene expression. *J Biol Chem* 271: 16567-16572.
 128. Munoz-Felix, J. M., M. Gonzalez-Nunez, C. Martinez-Salgado és J. M. Lopez-Novoa (2015). TGF-beta/BMP proteins as therapeutic targets in renal fibrosis. Where have we arrived after 25years of trials and tribulations? *Pharmacol Ther* 156: 44-58.
 129. Murzina, N., A. Verreault, E. Laue és B. Stillman (1999). Heterochromatin dynamics in mouse cells: interaction between chromatin assembly factor 1 and HP1 proteins. *Mol Cell* 4: 529-540.
 130. Mustafa, T., S. Y. Chai, F. A. Mendelsohn, I. Moeller és A. L. Albiston (2001). Characterization of the AT(4) receptor in a human neuroblastoma cell line (SK-N-MC). *J Neurochem* 76: 1679-1687.
 131. Nagy, J. (2013). [The chronic kidney disease "epidemy"]. *Orv Hetil* 154: 43-51.
 132. Naito, T., T. Masaki, D. J. Nikolic-Paterson, C. Tanji, N. Yorioka és N. Kohno (2004). Angiotensin II induces thrombospondin-1 production in human mesangial cells via p38 MAPK and JNK: a mechanism for activation of latent TGF-beta1. *Am J Physiol Renal Physiol* 286: F278-287.
 133. Nakagawa, N. és J. S. Duffield (2013). Myofibroblasts in Fibrotic Kidneys. *Curr Pathobiol Rep* 1.
 134. Nozawa, R. S., K. Nagao, H. T. Masuda, O. Iwasaki, T. Hirota, N. Nozaki, H. Kimura és C. Obuse (2010). Human POGZ modulates dissociation of HP1alpha from mitotic chromosome arms through Aurora B activation. *Nat Cell Biol* 12: 719-727.

135. O'Connor, J. W. és E. W. Gomez (2013). Cell adhesion and shape regulate TGF-beta1-induced epithelial-myofibroblast transition via MRTF-A signaling. *PLoS One* 8: e83188.
136. Oda, T., Y. O. Jung, H. S. Kim, X. Cai, J. M. Lopez-Guisa, Y. Ikeda és A. A. Eddy (2001). PAI-1 deficiency attenuates the fibrogenic response to ureteral obstruction. *Kidney Int* 60: 587-596.
137. Oldfield, M. D., L. A. Bach, J. M. Forbes, D. Nikolic-Paterson, A. McRobert, V. Thallas, R. C. Atkins, T. Osicka, G. Jerums és M. E. Cooper (2001). Advanced glycation end products cause epithelial-myofibroblast transdifferentiation via the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *J Clin Invest* 108: 1853-1863.
138. Ozdemir, B. H., A. A. Ozdemir, R. Erdal, F. N. Ozdemir és M. Haberal (2011). Rapamycin prevents interstitial fibrosis in renal allografts through decreasing angiogenesis and inflammation. *Transplant Proc* 43: 524-526.
139. Pan, S. Y., Y. T. Chang és S. L. Lin (2014). Microvascular pericytes in healthy and diseased kidneys. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 7: 39-48.
140. Pani, A., J. Bragg-Gresham, M. Masala, D. Piras, A. Atzeni, M. G. Pilia, L. Ferreli, L. Balaci, N. Curreli, A. Delitala, F. Loi, G. R. Abecasis, D. Schlessinger és F. Cucca (2014). Prevalence of CKD and Its Relationship to eGFR-Related Genetic Loci and Clinical Risk Factors in the SardinIA Study Cohort. *J Am Soc Nephrol*.
141. Papadimitriou, E., D. Kardassis, A. Moustakas és C. Stournaras (2011). TGFbeta-induced early activation of the small GTPase RhoA is Smad2/3-independent and involves Src and the guanine nucleotide exchange factor Vav2. *Cell Physiol Biochem* 28: 229-238.
142. Piek, E., C. H. Heldin és P. Ten Dijke (1999). Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *FASEB J* 13: 2105-2124.
143. Piera-Velazquez, S. és S. A. Jimenez (2012). Molecular mechanisms of endothelial to mesenchymal cell transition (EndoMT) in experimentally induced fibrotic diseases. *Fibrogenesis Tissue Repair* 5 Suppl 1: S7.
144. Piera-Velazquez, S., Z. Li és S. A. Jimenez (2011). Role of endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of fibrotic disorders. *Am J Pathol* 179: 1074-1080.

145. Qi, W., X. Chen, P. Poronnik és C. A. Pollock (2006). The renal cortical fibroblast in renal tubulointerstitial fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 38: 1-5.
146. Quaggin, S. E. és A. Kapus (2011). Scar wars: mapping the fate of epithelial-mesenchymal-myofibroblast transition. *Kidney Int* 80: 41-50.
147. Ridker, P. M., C. L. Gaboury, P. R. Conlin, E. W. Seely, G. H. Williams és D. E. Vaughan (1993). Stimulation of plasminogen activator inhibitor in vivo by infusion of angiotensin II. Evidence of a potential interaction between the renin-angiotensin system and fibrinolytic function. *Circulation* 87: 1969-1973.
148. Risdon, R. A., J. C. Sloper és H. E. De Wardener (1968). Relationship between renal function and histological changes found in renal-biopsy specimens from patients with persistent glomerular nephritis. *Lancet* 2: 363-366.
149. Rodrigues Diez, R., R. Rodrigues-Diez, C. Lavoiz, S. Rayego-Mateos, E. Civantos, J. Rodriguez-Vita, S. Mezzano, A. Ortiz, J. Egido és M. Ruiz-Ortega (2010). Statins inhibit angiotensin II/Smad pathway and related vascular fibrosis, by a TGF-beta-independent process. *PLoS One* 5: e14145.
150. Rodriguez-Vita, J., E. Sanchez-Lopez, V. Esteban, M. Ruperez, J. Egido és M. Ruiz-Ortega (2005). Angiotensin II activates the Smad pathway in vascular smooth muscle cells by a transforming growth factor-beta-independent mechanism. *Circulation* 111: 2509-2517.
151. Rostaing, L., A. Hertig, L. Albano, D. Anglicheau, A. Durrbach, V. Vuiblet, B. Moulin, P. Merville, M. Hazzan, P. Lang, G. Touchard, B. Hurault deLigny, S. Quere, F. Di Giambattista, Y. C. Dubois, E. Rondeau és C. S. Group (2015). Fibrosis progression according to epithelial-mesenchymal transition profile: a randomized trial of everolimus versus CsA. *Am J Transplant* 15: 1303-1312.
152. Ruster, C. és G. Wolf (2011). Angiotensin II as a morphogenic cytokine stimulating renal fibrogenesis. *J Am Soc Nephrol* 22: 1189-1199.
153. Sakamoto, I., Y. Ito, M. Mizuno, Y. Suzuki, A. Sawai, A. Tanaka, S. Maruyama, Y. Takei, Y. Yuzawa és S. Matsuo (2009). Lymphatic vessels develop during tubulointerstitial fibrosis. *Kidney Int* 75: 828-838.
154. Sanderson, N., V. Factor, P. Nagy, J. Kopp, P. Kondaiah, L. Wakefield, A. B. Roberts, M. B. Sporn és S. S. Thorgeirsson (1995). Hepatic expression of mature

- transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 2572-2576.
155. Schainuck, L. I., G. E. Striker, R. E. Cutler és E. P. Benditt (1970). Structural-functional correlations in renal disease. II. The correlations. *Hum Pathol* 1: 631-641.
 156. Scharenberg, M. A., R. Chiquet-Ehrismann és M. B. Asparuhova (2010). Megakaryoblastic leukemia protein-1 (MKL1): Increasing evidence for an involvement in cancer progression and metastasis. *Int J Biochem Cell Biol* 42: 1911-1914.
 157. Scharenberg, M. A., B. E. Pippenger, R. Sack, D. Zingg, J. Ferralli, S. Schenk, I. Martin és R. Chiquet-Ehrismann (2014). TGF-beta-induced differentiation into myofibroblasts involves specific regulation of two MKL1 isoforms. *J Cell Sci* 127: 1079-1091.
 158. Schiffer, M., L. E. Schiffer, A. Gupta, A. S. Shaw, I. S. Roberts, P. Mundel és E. P. Bottinger (2002). Inhibitory smads and tgfbeta signaling in glomerular cells. *J Am Soc Nephrol* 13: 2657-2666.
 159. Schmitz, U., K. Thommes, I. Beier, W. Wagner, A. Sachinidis, R. Dusing és H. Vetter (2001). Angiotensin II-induced stimulation of p21-activated kinase and c-Jun NH2-terminal kinase is mediated by Rac1 and Nck. *J Biol Chem* 276: 22003-22010.
 160. Schrimpf, C., C. Xin, G. Campanholle, S. E. Gill, W. Stallcup, S. L. Lin, G. E. Davis, S. A. Gharib, B. D. Humphreys és J. S. Duffield (2012). Pericyte TIMP3 and ADAMTS1 modulate vascular stability after kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 23: 868-883.
 161. Sebe, A., Z. Erdei, K. Varga, C. Bodor, I. Mucsi és L. Rosivall (2010). Cdc42 regulates myocardin-related transcription factor nuclear shuttling and alpha-smooth muscle actin promoter activity during renal tubular epithelial-mesenchymal transition. *Nephron Exp Nephrol* 114: e117-125.
 162. Sebe, A., S. K. Leivonen, A. Fintha, A. Masszi, L. Rosivall, V. M. Kahari és I. Mucsi (2008). Transforming growth factor-beta-induced alpha-smooth muscle cell actin expression in renal proximal tubular cells is regulated by p38beta mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated protein kinase1,2 and the Smad signalling during epithelial-myofibroblast transdifferentiation. *Nephrol Dial Transplant* 23: 1537-1545.

163. Sebe, A., A. Masszi, M. Zulys, T. Yeung, P. Speight, O. D. Rotstein, H. Nakano, I. Mucsi, K. Szaszi és A. Kapus (2008). Rac, PAK and p38 regulate cell contact-dependent nuclear translocation of myocardin-related transcription factor. *FEBS Lett* 582: 291-298.
164. Servais, A., V. Meas-Yedid, L. H. Noel, F. Martinez, C. Panterne, H. Kreis, J. Zuber, M. O. Timsit, C. Legendre, J. C. Olivo-Marin és E. Thervet (2011). Interstitial fibrosis evolution on early sequential screening renal allograft biopsies using quantitative image analysis. *Am J Transplant* 11: 1456-1463.
165. Shi, Y., Y. F. Wang, L. Jayaraman, H. Yang, J. Massague és N. P. Pavletich (1998). Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling. *Cell* 94: 585-594.
166. Shimizu, R. T., R. S. Blank, R. Jervis, S. C. Lawrenz-Smith és G. K. Owens (1995). The smooth muscle alpha-actin gene promoter is differentially regulated in smooth muscle versus non-smooth muscle cells. *J Biol Chem* 270: 7631-7643.
167. Shimmi, O. és S. J. Newfeld (2013). New insights into extracellular and post-translational regulation of TGF-beta family signalling pathways. *J Biochem* 154: 11-19.
168. Shukla, P., C. Vogl, B. Wallner, D. Rigler, M. Muller és S. Macho-Maschler (2015). High-throughput mRNA and miRNA profiling of epithelial-mesenchymal transition in MDCK cells. *BMC Genomics* 16: 944.
169. Sison, K., V. Eremina, H. Baelde, W. Min, M. Hirashima, I. G. Fantus és S. E. Quaggin (2010). Glomerular structure and function require paracrine, not autocrine, VEGF-VEGFR-2 signaling. *J Am Soc Nephrol* 21: 1691-1701.
170. Striker, G. E., L. I. Schainuck, R. E. Cutler és E. P. Benditt (1970). Structural-functional correlations in renal disease. I. A method for assaying and classifying histopathologic changes in renal disease. *Hum Pathol* 1: 615-630.
171. Szelestei, T., Rempert, Á, Gergely, L (2011). A vesetranszplantáció aktuális kérdései. *Hypertonia és Nephrologia* 15: 31-34.
172. Terebessy, T., A. Masszi, A. Fintha, A. Sebe, T. Huszar, L. Rosivall és I. Mucsi (2004). Angiotensin II activates the human renin promoter in an in vitro model: the role of c-Jun-N-terminal kinase. *Nephrol Dial Transplant* 19: 2184-2191.

173. van Leeuwen, R. T., A. Kol, F. Andreotti, C. Kluft, A. Maseri és G. Sperti (1994). Angiotensin II increases plasminogen activator inhibitor type 1 and tissue-type plasminogen activator messenger RNA in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circulation* 90: 362-368.
174. Velasquez, L. S., L. B. Sutherland, Z. Liu, F. Grinnell, K. E. Kamm, J. W. Schneider, E. N. Olson és E. M. Small (2013). Activation of MRTF-A-dependent gene expression with a small molecule promotes myofibroblast differentiation and wound healing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 16850-16855.
175. von Gersdorff, G., K. Susztak, F. Rezvani, M. Bitzer, D. Liang és E. P. Bottinger (2000). Smad3 and Smad4 mediate transcriptional activation of the human Smad7 promoter by transforming growth factor beta. *J Biol Chem* 275: 11320-11326.
176. Wada, T., N. Sakai, Y. Sakai, K. Matsushima, S. Kaneko és K. Furuichi (2011). Involvement of bone-marrow-derived cells in kidney fibrosis. *Clin Exp Nephrol* 15: 8-13.
177. Wang, D. Z., S. Li, D. Hockemeyer, L. Sutherland, Z. Wang, G. Schratt, J. A. Richardson, A. Nordheim és E. N. Olson (2002). Potentiation of serum response factor activity by a family of myocardin-related transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 14855-14860.
178. Wang, S. és R. Hirschberg (2003). BMP7 antagonizes TGF-beta -dependent fibrogenesis in mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 284: F1006-1013.
179. Weiss, A. és L. Attisano (2013). The TGFbeta superfamily signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2: 47-63.
180. Wen, C. P., T. Y. Cheng, M. K. Tsai, Y. C. Chang, H. T. Chan, S. P. Tsai, P. H. Chiang, C. C. Hsu, P. K. Sung, Y. H. Hsu és S. F. Wen (2008). All-cause mortality attributable to chronic kidney disease: a prospective cohort study based on 462 293 adults in Taiwan. *Lancet* 371: 2173-2182.
181. Wen, C. P., K. Matsushita, J. Coresh, K. Iseki, M. Islam, R. Katz, W. McClellan, C. A. Peralta, H. Wang, D. de Zeeuw, B. C. Astor, R. T. Gansevoort, A. S. Levey és A. Levin (2014). Relative risks of chronic kidney disease for mortality and end-stage renal disease across races are similar. *Kidney Int*.
182. Westerhausen, D. R., Jr., W. E. Hopkins és J. J. Billadello (1991). Multiple transforming growth factor-beta-inducible elements regulate expression of the

- plasminogen activator inhibitor type-1 gene in Hep G2 cells. *J Biol Chem* 266: 1092-1100.
183. Wilson, H. M., N. E. Haites és N. A. Booth (1997). Effect of angiotensin II on plasminogen activator inhibitor-1 production by cultured human mesangial cells. *Nephron* 77: 197-204.
 184. Wolf, G. (1998). Link between angiotensin II and TGF-beta in the kidney. *Miner Electrolyte Metab* 24: 174-180.
 185. Wolf, G., E. Mueller, R. A. Stahl és F. N. Ziyadeh (1993). Angiotensin II-induced hypertrophy of cultured murine proximal tubular cells is mediated by endogenous transforming growth factor-beta. *J Clin Invest* 92: 1366-1372.
 186. Wolf, G., F. N. Ziyadeh és R. A. Stahl (1999). Angiotensin II stimulates expression of transforming growth factor beta receptor type II in cultured mouse proximal tubular cells. *J Mol Med (Berl)* 77: 556-564.
 187. Wolf, G., F. N. Ziyadeh, G. Zahner és R. A. Stahl (1995). Angiotensin II-stimulated expression of transforming growth factor beta in renal proximal tubular cells: attenuation after stable transfection with the c-mas oncogene. *Kidney Int* 48: 1818-1827.
 188. Wu, C. F., W. C. Chiang, C. F. Lai, F. C. Chang, Y. T. Chen, Y. H. Chou, T. H. Wu, G. R. Linn, H. Ling, K. D. Wu, T. J. Tsai, Y. M. Chen, J. S. Duffield és S. L. Lin (2013). Transforming growth factor beta-1 stimulates profibrotic epithelial signaling to activate pericyte-myofibroblast transition in obstructive kidney fibrosis. *Am J Pathol* 182: 118-131.
 189. Xu, H., X. Wu, H. Qin, W. Tian, J. Chen, L. Sun, M. Fang és Y. Xu (2014). Myocardin-Related Transcription Factor A Epigenetically Regulates Renal Fibrosis in Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*.
 190. Yang, J. és Y. Liu (2001). Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. *Am J Pathol* 159: 1465-1475.
 191. Yang, R., T. Walther, F. Gembardt, I. Smolders, P. Vanderheyden, A. L. Albiston, S. Y. Chai és A. G. Dupont (2010). Renal vasoconstrictor and pressor responses to angiotensin IV in mice are AT1a-receptor mediated. *J Hypertens* 28: 487-494.

192. Yin, G., C. Yan és B. C. Berk (2003). Angiotensin II signaling pathways mediated by tyrosine kinases. *Int J Biochem Cell Biol* 35: 780-783.
193. Yu, F., L. H. Wu, Y. Tan, L. H. Li, C. L. Wang, W. K. Wang, Z. Qu, M. H. Chen, J. J. Gao, Z. Y. Li, X. Zheng, J. Ao, S. N. Zhu, S. X. Wang, M. H. Zhao, W. Z. Zou és G. Liu (2010). Tubulointerstitial lesions of patients with lupus nephritis classified by the 2003 International Society of Nephrology and Renal Pathology Society system. *Kidney Int* 77: 820-829.
194. Zeisberg, E. M., S. E. Potenta, H. Sugimoto, M. Zeisberg és R. Kalluri (2008). Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol* 19: 2282-2287.
195. Zeisberg, M. és E. G. Neilson (2009). Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest* 119: 1429-1437.
196. Zeisberg, M. és E. G. Neilson (2010). Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 21: 1819-1834.
197. Zhang, G., K. A. Kernan, S. J. Collins, X. Cai, J. M. Lopez-Guisa, J. L. Degen, Y. Shvil és A. A. Eddy (2007). Plasmin(ogen) promotes renal interstitial fibrosis by promoting epithelial-to-mesenchymal transition: role of plasmin-activated signals. *J Am Soc Nephrol* 18: 846-859.
198. Zhang, J., N. A. Noble, W. A. Border, R. T. Owens és Y. Huang (2008). Receptor-dependent prorenin activation and induction of PAI-1 expression in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295: E810-819.
199. Zhang, J., J. Wu, C. Gu, N. A. Noble, W. A. Border és Y. Huang (2012). Receptor-mediated nonproteolytic activation of prorenin and induction of TGF-beta1 and PAI-1 expression in renal mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 303: F11-20.
200. Zhang, Y. E. (2009). Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res* 19: 128-139.
201. Zhao, H., Y. Dong, X. Tian, T. K. Tan, Z. Liu, Y. Zhao, Y. Zhang, D. Harris és G. Zheng (2013). Matrix metalloproteinases contribute to kidney fibrosis in chronic kidney diseases. *World J Nephrol* 2: 84-89.
202. Zheng, H., R. Ma, Q. Wang, P. Zhang, D. Li, Q. Wang, J. Wang, H. Li, H. Liu és Z. Wang (2015). MiR-625-3p promotes cell migration and invasion via inhibition of SCAI in colorectal carcinoma cells. *Oncotarget* 6: 27805-27815.

10 Saját publikációk jegyzéke

10.1 A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

1. Fintha A, Gasparics Á, Fang L, Erdei Z, Hamar P, Mózes MM, Kökény G, Rosivall L, Sebe A. (2013) Characterization and role of SCAI during renal fibrosis and epithelial-to-mesenchymal transition. *Am J Pathol.* 182: 388-400.
2. Fintha A, Sebe A, Masszi A, Terebessy T, Huszár T, Rosivall L, Mucsi I. (2007) Angiotensin II activates plasminogen activator inhibitor-I promoter in renal tubular epithelial cells via the AT1 receptor. *Acta Physiol Hung.* 94:19-30.
3. Gasparics Á, Kökény G, Fintha A, Bencs R, Mózes MM, Ágoston EI, Buday A, Ivics Z, Hamar P, Györffy B, Rosivall L, Sebe A. (2017) Alterations in SCAI expression during cell plasticity, fibrosis and cancer. *Pathol Oncol Res.* 2017 Aug 16. [Epub ahead of print]

10.2 A disszertációtól független közlemények

1. Bánfi G, Teleki I, Nyirády P, Keszthelyi A, Romics I, Fintha A, Krenács T, Szende B. (2015) Changes of protein expression in prostate cancer having lost its androgen sensitivity. *Int Urol Nephrol.* 47: 1149-1154.
2. Studinger P, Cseprekál O, Fintha A, Kardos M, Tislér A. (2013) A membranosus nephropathia korszerű diagnosztikája és kezelése. *Hypertonia és nephrologia.* 17: 201-206
3. Székely E, Törzsök P, Riesz P, Korompay A, Fintha A, Székely T, Lotz G, Nyirády P, Romics I, Tímár J, Schaff Z, Kiss A. (2011) Expression of claudins and their prognostic significance in noninvasive urothelial neoplasms of the human urinary bladder. *J Histochem Cytochem.* 59: 932-941.
4. Bata P, Szendrői A, Tóth G, Lovász S, Fintha A, Romics I, Bérczi V. (2009)

Diagnostic and treatment options in a papillary pelvic tumor patient with solitary kidney refusing nephrectomy. *European Journal of Radiology Extra* 72: E17-E19

5. Komlosi P, Banizs B, Fintha A, Steele S, Zhang ZR, Bell PD. (2008) Oscillating cortical thick ascending limb cells at the juxtaglomerular apparatus. *J Am Soc Nephrol*. 19: 1940-1946.

6. Hovater MB, Olteanu D, Hanson EL, Cheng NL, Siroky B, Fintha A, Komlosi P, Liu W, Satlin LM, Bell PD, Yoder BK, Schwiebert EM. (2008) Loss of apical monocilia on collecting duct principal cells impairs ATP secretion across the apical cell surface and ATP-dependent and flow-induced calcium signals. *Purinergic Signal*. 4: 155-170.

7. Sebe A, Leivonen SK, Fintha A, Masszi A, Rosivall L, Kähäri VM, Mucsi I. (2008) Transforming growth factor-beta-induced alpha-smooth muscle cell actin expression in renal proximal tubular cells is regulated by p38beta mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated protein kinase1,2 and the Smad signalling during epithelial-myofibroblast transdifferentiation. *Nephrol Dial Transplant*. 23: 1537-1545.

8. Rosivall L, Peti-Peterdi J, Rázga Z, Fintha A, Bodor C, MirzaHosseini S. (2007) Renin-angiotensin system affects endothelial morphology and permeability of renal afferent arteriole. *Acta Physiol Hung*. 94: 7-17.

9. Komlosi P, Fintha A, Bell PD. (2006) Unraveling the relationship between macula densa cell volume and luminal solute concentration/osmolality. *Kidney Int*. 70: 865-871.

10. Siroky BJ, Ferguson WB, Fuson AL, Xie Y, Fintha A, Komlosi P, Yoder BK, Schwiebert EM, Guay-Woodford LM, Bell PD. (2006) Loss of primary cilia results in deregulated and unabated apical calcium entry in ARPKD collecting duct cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 290: F1320-1328.

11. Unlap MT, Williams C, Morin D, Siroky B, Fintha A, Fuson A, Dodgen L, Kovacs G, Komlosi P, Ferguson W, Bell PD. Amyloid beta peptide 1-40 stimulates the

Na⁺/Ca²⁺ exchange activity of SNCX. (2005) *Curr Neurovasc Res*. 2: 3-12.

12. Komlosi P, Fintha A, Bell PD. (2005) Renal cell-to-cell communication via extracellular ATP. *Physiology (Bethesda)*. 20: 86-90. Review.

13. Komlosi P, Frische S, Fuson AL, Fintha A, Zsembery A, Peti-Peterdi J, Bell PD. (2005) Characterization of basolateral chloride/bicarbonate exchange in macula densa cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 288: F380-386.

14. Komlosi P, Fintha A, Bell PD. (2004) Current mechanisms of macula densa cell signalling. *Acta Physiol Scand* 181: 463-469. Review.

15. Terebessy T, Masszi A, Fintha A, Sebe A, Huszár T, Rosivall L, Mucsi I. (2004) Angiotensin II activates the human renin promoter in an in vitro model: the role of c-Jun-N-terminal kinase. *Nephrol Dial Transplant*. 19: 2184-2191.

16. Peti-Peterdi J, Fintha A, Fuson AL, Tousson A, Chow RH. (2004) Real-time imaging of renin release in vitro. *Am J Physiol Renal Physiol*. 287: F329-335.

17. Komlosi P, Peti-Peterdi J, Fuson AL, Fintha A, Rosivall L, Bell PD. (2004) Macula densa basolateral ATP release is regulated by luminal [NaCl] and dietary salt intake. *Am J Physiol Renal Physiol*. 286: F1054-1058.

18. Komlosi P, Fuson AL, Fintha A, Peti-Peterdi J, Rosivall L, Warnock DG, Bell PD. Angiotensin I conversion to angiotensin II stimulates cortical collecting duct sodium transport. (2003) *Hypertension*. 42: 195-199.

11 Köszönetnyilvánítás

Dolgozatom összeállításában és az azt megelőző munkában köszönöm Családom, kollégáim, ismerőseim, barátaim türelmét és bátorítását.

Köszönöm Szüleimnek a támogatást, és hogy mindig mellettem álltak.

Köszönöm korábbi tanárainknak és munkatársainknak, akiknek hosszú listája miatt az alábbi felsorolás csak részleges lehet.

Köszönöm Dr. Mucsi Istvánnak, aki egyetemi tudományos munkám első lépéseit vezette, és akinek komplex tudományos szemléletmódja azóta is meghatározó számomra. Köszönöm Prof. Rosivall Lászlónak és az általa megalapított Magyar Vese-Alapítványnak valamint a Nemzetközi Nephrológiai Kutató- és Képző Központnak a vese iránti érdeklődésem feléledéséhez és a vizsgálatokban történő elmélyüléséhez adott támogatását.

Köszönöm Dr. Sebe Attilának, aki témavezetőként és barátomként állt mellettem.

Köszönöm Dr. Terebessy Tamás, Dr. Masszi András és Dr. Huszár Tamás hasznos tanácsait és támogatását, lelkesedésük és kitartásuk máig példaként van előttem.

Életem egyik szép és meghatározó szakaszát jelentette, amikor Prof. Peti-Peterdi János és Prof. Darwin Bell laboratóriumában dolgozhattam.

Köszönöm Dr. Komlósi Péternek, akitől rengeteget tanultam, és akit barátomnak tekinthetek.

Köszönöm korábbi intézetvezetőimnek, Prof. Schaff Zsuzsának és Prof. Tímár Józsefnek, valamint jelenlegi intézetvezetőmnek, Prof. Kiss Andrásnak mindazon lehetőségeket és körülményeket, amelyeket megnyitottak és biztosítottak számomra, és a sok bátorítást a nehéz időszakokban.

Köszönöm mindazoknak, akik segítettek a dolgozatom végső formájának összeállításában, illetve véleményezték azt, és akiknek névsora nem lehet teljes.

Köszönöm a Semmelweis Egyetem Kórélettani Intézet és 2. sz. Patológiai Intézet valamennyi munkatársának a segítséget.